

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA**

**Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu
Piaractus mesopotamicus e o uso dos isótopos estáveis de
carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da
incorporação do alimento no tecido larval**

Rosangela Kiyoko Jomori

Zootecnista

Jaboticabal – São Paulo

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA

2 00413
tese
J750

**Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu
Piaractus mesopotamicus e o uso dos isótopos estáveis de
carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da
incorporação do alimento no tecido larval**



Rosangela Kiyoko Jomori

Orientadora: Maria Célia Portella

Co-orientador: Dalton José Carneiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da UNESP, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM AQUICULTURA – Área de Concentração em Aqüicultura em Águas Continentais.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Jaboticabal – São Paulo

2005

Jomori, Rosangela Kiyoko
J75o Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval / Rosangela Kiyoko Jomori.--Jaboticabal, 2005
vii, 121f. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2005

Orientadora: Maria Célia Portella

Banca examinadora: Carlos Ducatti, José Augusto Senhorini, José Eurico Possebon Cyrino, Wagner Cotroni Valenti

Bibliografia

1. larvas de peixes. 2. alimentação. 3. isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. I. Título. II. Jaboticabal – Centro de Aqüicultura da UNESP.

CDU 639.3: 54.027

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

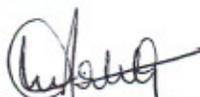
TÍTULO: "Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu Piaractus mesopotamicus e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval.

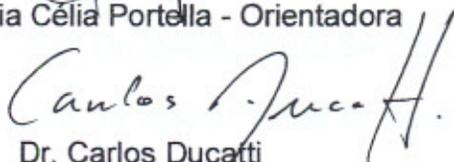
AUTORA: ROSÂNGELA KIYOKO JOMORI

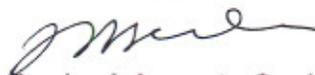
ORIENTADORA: Dra. Maria Célia Portella

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTOR EM AQUICULTURA**, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: AQUICULTURA EM ÁGUAS CONTINENTAIS, pela Comissão Examinadora:




Dra. Maria Célia Portella - Orientadora


Dr. Carlos Ducatti


Dr. José Augusto Senhorini


Dr. José Eurico Possebon Cyrino


Dr. Wagner Cotroni Valenti

Data da realização: 29 de julho de 2005.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. Maria Célia Portella

Coordenação do Programa de Pós-graduação – Centro de Aquicultura da Unesp
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n Cep 14884-900 Jaboticabal SP Brasil.
Tel (16) 3203-2110/3209-2615 ramal 214 Fax (16) 3203.2268
pgaqui@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

Agradecimentos

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus orientadores: Profa Dra Maria Célia Portella e Prof Dr Dalton José Carneiro pelo apoio, amizade e disponibilidade;

Ao Prof Dr Carlos Ducatti pela confiança, orientação e oportunidade de realizar o estudo com os isótopos estáveis ambientais;

Aos membros da Banca Examinadora: Prof Dr José Augusto Senhorini, Prof Dr José Eurico P. Cyrino, Prof Dr Wagner Cotroni Valenti e Prof Dr Carlos Ducatti pela análise cuidadosa do trabalho e importantes sugestões;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelas concessões da Bolsa de Estudo e Reserva Técnica para a realização dessa pesquisa;

Aos colegas e funcionários do Caunesp e Biblioteca pela amizade e contribuição sempre que solicitada;

Ao amigo Claudinei da Cruz pelo processamento do material histológico;

Aos colegas Evandro T. Silva, Cibele, Sílvia, Ricardo, Juliana e Fabiana do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP de Botucatu pela amizade, disposição e ajuda nas análises isotópicas;

Ao Prof Dr Jener S. Zuanon pela ajuda e conversas iniciais sobre os isótopos estáveis;

Aos colegas Marcelo Tesser, Rodrigo Takata, Thomaz Jordão Sousa Ayres, Thiago El Hadi Perez Fabregat, Camila Antônio, Adriana P. Muñoz Ramirez, Camilo Guerrero-Alvarado pela amizade e ajuda na execução dos trabalhos;

Agradeço à amiga Cláudia A. Honorato da Silva pela amizade, companhia nas longas noites que passávamos trabalhando no laboratório, e pela importante ajuda no processamento do material para as análises isotópicas;

Agradeço ao amigo Ronald Kenndey Luz pela ajuda oferecida na montagem do último experimento (referente aos isótopos estáveis) quando eu passava por momentos de perda na família;

Agradeço ao meu irmão Ronaldo K. Jomori pela edição das fotos apresentadas no trabalho, atenção e disponibilidade;

Agradeço à minha Família.... à todos que sempre me apoiaram;

Ao meu companheiro Fábio J. Bonichelli por toda compreensão e apoio.

Sumário

	Página
Lista de Ilustrações	iii
Resumo	01
1. Introdução Geral	03
2. Referências Bibliográficas	07
Capítulo I – Desenvolvimento do trato digestório e desempenho de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas com náuplios de <i>Artemia</i> e plâncton natural.....	10
Resumo	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
2. Material e Métodos.....	14
3. Resultados.....	17
4. Discussão	25
5. Agradecimentos.....	29
6. Referências Bibliográficas.....	30
Capítulo II – Substituição precoce do alimento vivo por dieta seca na larvicultura do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	34
Resumo	34
Abstract.....	35
1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos.....	37

Experimento I. Substituição do alimento vivo por dieta seca em diferentes tempos ..	38
Experimento II – Diferentes dietas secas como substitutos, precoce e tardio, do alimento vivo.....	39
3. Resultados	43
Experimento I. Substituição do alimento vivo por dieta seca em diferentes tempos	43
Experimento II – Diferentes dietas secas como substitutos, precoce e tardio, do alimento vivo.....	45
4. Discussão	62
5. Agradecimentos	69
6. Referências Bibliográficas.....	69
Capítulo III: Isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	73
Resumo	73
Abstract.....	74
1. Introdução.....	75
2. Material e Métodos.....	79
3. Resultados e Discussão	89
4. Agradecimentos	112
5. Referências Bibliográficas.....	112
Conclusões gerais e considerações.....	119



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Capítulo I – Desenvolvimento do trato digestório e desempenho de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas com náuplios de <i>Artemia</i> e plâncton natural.....	10
Tabela 1- Valores médios de comprimento total (mm) das larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> criadas com diferentes tipos de alimento vivo.....	17
Tabela 2- Valores médios de peso (mg) das larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> criadas com diferentes tipos de alimento vivo.	18
Figura 1- Valores médios da taxa de crescimento específico de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas com plâncton natural ou náuplios de <i>Artemia</i>, durante 15 dias.....	19
Figura 2- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas com náuplios de <i>Artemia</i>	20
Figura 3- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas com plâncton natural.....	21
Figura 4- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> aos 15 dias após o início da alimentação exógena (larvas com 15 dias de vida).....	22
Figura 5- Participação percentual média dos organismos zooplânctônicos na composição do plâncton oferecido às larvas de pacu, durante 15 dias de alimentação	23

Figura 6- Valores médios da taxa de sobrevivência de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas com plâncton natural e náuplios de <i>Artemia</i> , ao final de 15 dias.....	24
Capítulo II – Substituição precoce do alimento vivo por dieta seca na larvicultura do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	34
Tabela 1- Formulação e composição química analisada das dietas experimentais.....	41
Tabela 2- Valores médios de peso úmido (mg) das larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidas a dois tempos de substituição do alimento vivo com diferentes dietas secas.....	46
Tabela 3- Valores médios e desvio padrão da solubilidade (em sólidos totais) das diferentes dietas secas utilizadas como substituto do alimento vivo na larvicultura do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	62
Figura 1- Esquema dos tratamentos alimentares e quantidade de náuplios de <i>Artemia</i> oferecida às larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	38
Figura 2- Representação esquemática dos diferentes momentos para a substituição do alimento vivo e dos protocolos alimentares adotados no experimento.....	40
Figura 3- Valores médios de comprimento total e peso das larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidas a diferentes tempos para a substituição do alimento vivo por dieta seca.....	44
Figura 4- Valores médios das taxas de sobrevivência de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidas a diferentes tempos para a substituição do alimento vivo por dieta seca.....	45

Figura 5- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	50
Figura 6- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	51
Figura 7- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> após 12 dias do início da alimentação exógena.....	52
Figura 8- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> após 12 dias do início da alimentação exógena.....	53
Figura 9- Distribuição das larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> em classes de tamanho (mm) obtida ao final de 35 dias do início da alimentação exógena.....	54
Figura 10- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> aos 15 dias do início da alimentação exógena	55
Figura 11- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> após 21 dias do início da alimentação exógena.....	56
Figura 12- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> após 21 dias do início da alimentação exógena.....	57
Figura 13- Valores médios das taxas de sobrevivência de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> , ao final de 35 dias do início da alimentação exógena.....	58

Figura 3- Valores do $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> separadas em cabeça e parte restante do corpo	95
Figura 4- Valores do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> separadas por classes de tamanho.....	97
Figura 5- Valores do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> mantidas em jejum e alimentadas exclusivamente com náuplios de <i>Artemia</i> ou dieta seca	99
Figura 6- Valores do $\delta^{13}\text{C}$ de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três, seis e 12 dias após o início da alimentação exógena e larvas alimentadas com náuplios de <i>Artemia</i> + dieta seca por todo o período .	104
Figura 7- Valores do $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três, seis e 12 dias após o início da alimentação exógena e larvas alimentadas com náuplios de <i>Artemia</i> + dieta seca por todo o período .	105
Figura 8 - Valores do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentadas exclusivamente com náuplios de <i>Artemia</i> ou dieta seca	107
Anexo 1- Exemplares de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> de diferentes tamanhos, em comprimento total (mm), evidenciando as diferenças morfológicas entre os animais ao longo do desenvolvimento larval	117
Anexo 2- Larvas de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> de diferentes tamanhos evidenciando a presença de restos alimentares no tubo digestivo	118

Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval

Resumo. O estudo teve por objetivo comparar o desempenho e o desenvolvimento do trato digestório de larvas de pacu alimentadas com plâncton natural e náuplios de *Artemia* nas primeiras semanas de vida; determinar o melhor momento para iniciar a substituição do alimento vivo; comparar o potencial de diferentes dietas secas como substitutos parciais do alimento vivo; identificar pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) os alimentos (vivo e seco) aproveitados pelas larvas de pacu ao longo do seu desenvolvimento, através da retenção dos átomos de carbono e nitrogênio dos diferentes alimentos nos tecidos corporais. O trabalho está sendo apresentado na forma de três capítulos, além de uma introdução geral. Em síntese, os náuplios de *Artemia* foram mais efetivos que o plâncton natural para a alimentação inicial das larvas de pacu criadas em laboratório, pois favoreceram o crescimento e o desenvolvimento ontogenético do trato digestório das mesmas. As taxas de crescimento específico proporcionadas pelo plâncton natural variaram conforme os organismos predominantes na composição desse alimento. Em relação aos estudos sobre a substituição do alimento vivo por dieta seca, o tamanho do animal foi um aspecto importante, mas a qualidade da dieta seca foi decisiva para garantir o sucesso desse procedimento. Assim, larvas com cerca de 13mg de peso úmido (12 dias após o início da alimentação exógena) mostraram-se capazes de aproveitar a dieta seca. Larvas que tiveram o alimento vivo totalmente suprimido nessa fase não apresentaram prejuízos à sobrevivência, e os resultados de crescimento foram considerados satisfatórios, pois, ao final de 35 dias de alimentação, esses animais apresentaram crescimento superior ao obtido no tratamento controle (alimento vivo por todo o período). Larvas alimentadas exclusivamente com a dieta seca desde o início

mostraram-se capazes de sobreviver e crescer; por outro lado, as taxas de sobrevivência foram baixas (5 a 20%). Pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), o perfil isotópico do tecido larval mostrou-se intimamente relacionado com o respectivo tratamento alimentar aplicado. A técnica foi bastante eficaz e claramente puderam ser definidos os momentos em que as larvas utilizaram os náuplios de *Artemia* como fonte alimentar e, posteriormente, a dieta seca. No caso da dieta seca, diferentes momentos para o início da retenção dos nutrientes desse alimento no tecido larval foram revelados, e animais com cerca de 10mg de peso úmido mostraram-se mais capacitados para o aproveitamento do alimento seco, bem como para o início da escolha voluntária desse alimento.

1. Introdução Geral

Os recursos pesqueiros são importantes fontes de alimento de alta qualidade. A produção pesqueira mundial em 2003 foi de 132,2 milhões de toneladas e desse total, 103 milhões de toneladas foram destinados à alimentação humana, com um consumo de 16,3 kg per capita considerando uma população de 6,3 bilhões de pessoas (FAO, 2004). Essa atividade que tem se expandido rapidamente e, no cenário mundial, enquanto a produção aquícola teve um crescimento de 187,6% entre os anos de 1990 a 2001, as capturas pesqueiras apresentaram um aumento de apenas 7,8% no mesmo período. No Brasil, o ritmo de crescimento não tem sido menor que o verificado em escala mundial (BORGHETTI et al., 2003), com um enorme potencial, ainda, para o desenvolvimento dessa atividade (QUEIROZ et al., 2005). Nesse contexto, um planejamento adequado associado à conservação ambiental, aos avanços tecnológicos e ao aprimoramento das técnicas de produção, como reprodução, alimentação, manejo e qualidade da água, contribuem diretamente para o estabelecimento de uma atividade duradoura e o desenvolvimento de uma aquíicultura cada vez mais produtiva e econômica.

Das etapas que constituem o ciclo da produção de peixes, a larvicultura ainda enfrenta muitos desafios, principalmente quanto a alimentação inicial das larvas que possuem reservas vitelinas escassas e que são absorvidas em poucos dias. Essas larvas, também denominadas de *altriciais* por Alliot apud Rust et al. (1993), não possuem o sistema digestório completamente formado e funcional quando iniciam a alimentação exógena (DABROWSKI, 1984; KOLKOVSKI, 2001). Estudos sobre alimentação inicial de larvas altriciais mostram que o procedimento mais adequado é o fornecimento de organismos vivos (PERSON LE RUYET, 1989; BENGSTON, 1991; TANDLER e KOLKOVSKI, 1991).

No Brasil, a técnica adotada pela maioria dos produtores para a produção de juvenis de muitas espécies nativas consiste na criação semi-intensiva. Nesse sistema, as larvas são

transferidas para os viveiros previamente fertilizados logo após a abertura da boca, onde a principal fonte alimentar são os organismos que constituem o plâncton natural. No entanto, esse procedimento leva a uma produção bastante variável de alevinos (CESTAROLLI e PORTELLA, 1994) e com baixas taxas de sobrevivência (BASILE-MARTINS et al., 1987). Uma alternativa para esse sistema de produção é a criação intensiva das larvas no laboratório (CESTAROLLI e PORTELLA, 1994). Aumento nas taxas de sobrevivência de juvenis de pacu foi observado por Jomori et al. (2003) que criaram as larvas por um período inicial no laboratório antes de transferi-las para os viveiros fertilizados. Além de aumento da produtividade, os resultados obtidos também foram mais vantajosos em termos econômicos (JOMORI et al. 2005).

Os principais organismos vivos que vêm sendo utilizados na larvicultura intensiva são os náuplios de *Artemia*, os rotíferos produzidos em laboratório (NAEGEL, 1999; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001), além de organismos planctônicos provenientes de coletas em viveiros fertilizados (MEEREN, 1991a). De certa forma, a dependência das larvas por organismos vivos na alimentação inicial acaba limitando a produção nessa fase da criação; e também dificultado os estudos sobre nutrição de larvas de peixes, uma vez que os organismos vivos, como os rotíferos e *Artemia* não podem ser manipulados como desejado no sentido de determinar as exigências nutricionais das larvas (LAZO et al., 2000). O uso de dietas secas substituindo os organismos vivos é decisivo para a diminuição dos custos favorecendo a produção dos juvenis em larga escala (WATANABE e KIRON, 1994; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Estudos econômicos sobre a larvicultura de peixes têm mostrado que os gastos com organismos vivos (náuplios de *Artemia*) juntamente com a mão de obra constituem-se nos itens mais onerosos do custo de produção (SALLES, 1998; GUERRERO, 2003; JOMORI et al., 2005).

Na aquicultura brasileira, diferentes espécies vêm sendo consolidadas nas diversas regiões do país, como carpa *Cyprinus carpio* na região sul; tilápia *Oreochromis niloticus*, surubins *Pseudoplatystoma* spp., pacu *Piaractus mesopotamicus*, tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos nas regiões sudeste e oeste e tilápia no nordeste (QUEIROZ et al., 2005). Quase todas as espécies nativas anteriormente citadas apresentam larvas com características altriciais.

O presente estudo está inserido numa linha de pesquisa que teve início há cerca de seis anos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do CAUNESP, visando obter informações sobre a alimentação de larvas altriciais nativas. Portella et al. (1999) estudaram a substituição do alimento vivo pelo seco para larvas de tambaqui *Colossoma macropomum*. Em seguida, Jomori (1999) pesquisou o melhor nível e frequência de alimentação com náuplios de *Artemia*, e a substituição abrupta do alimento vivo por dieta seca microaglutinada na criação intensiva de larvas de pacu. Posteriormente, Macedo-Viegas et al. (2003) avaliaram dietas experimentais, contendo diferentes fontes protéicas (hidrolisado protéico de peixe, silagem de peixe e farinha de peixe), como substitutos do alimento vivo para larvas de pacu após o sexto dia do início da alimentação exógena. Em seguida, também para larvas de pacu, Tesser et al. (2005) avaliaram esquemas alimentares para a substituição gradual do alimento vivo por dieta microencapsulada, utilizando fase de alimentação mista (co-alimentação). Em todos esses estudos, os melhores resultados foram obtidos quanto maior o período de fornecimento do alimento vivo, ressaltando a dependência vital de organismos vivos na alimentação inicial das larvas dessas espécies. Enfatizando essa dependência, Tesser et al. (2005) demonstraram que as larvas alimentadas exclusivamente com as dietas secas apresentavam curva de mortalidade idêntica à das mantidas em jejum.

As pesquisas supra citadas abriram novas perspectivas de estudo quanto a alimentação de larvas altriciais espécies nativas, e a possibilidade de utilização das dietas secas, numa fase

mais precoce. Nesse sentido, o presente estudo foi proposto com o objetivo de dar essa continuidade, fazendo com que o acúmulo de informações possa aprofundar os conhecimentos nessa área e gerar informações mais elucidativas sobre a alimentação no período da larvicultura. O pacu *Piaractus mesopotamicus* foi escolhido como espécie modelo, uma vez que é comercialmente importante e apresenta larvas altriciais, representando um desafio para a utilização de alimento seco durante a larvicultura.

No presente estudo, além das informações sobre o crescimento e sobrevivência para avaliar o desempenho dos animais, também foram averiguados o desenvolvimento ontogenético do trato digestório ao longo do desenvolvimento larval e a utilização da técnica dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio como indicadores naturais dos alimentos (vivo e seco) metabolizados pelas larvas. A utilização dos isótopos estáveis como marcador das fontes energéticas ao longo da cadeia alimentar baseia-se na suposição de que o corpo do animal reflete isotopicamente a sua dieta (DE NIRO e EPSTEIN, 1978).

Os objetivos específicos da pesquisa foram:

- Comparar o desempenho das larvas de pacu alimentadas com diferentes organismos vivos - plâncton natural e náuplios de *Artemia* - nas primeiras semanas de vida.
- Determinar o melhor momento em que as larvas de pacu apresentam-se mais capacitadas para o aproveitamento da dieta seca, e comparar o potencial de diferentes dietas como substitutos parciais do alimento vivo.
- Rastrear pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) os alimentos (vivo e seco) aproveitados pelas larvas de pacu ao longo do seu desenvolvimento, e identificar o momento em que as larvas passam a utilizar os nutrientes

- da dieta seca através da retenção dos átomos de carbono e nitrogênio em seus tecidos corporais.

2. Referências Bibliográficas

- BASILE MARTINS, M. A.; YAMANAKA, N.; CESTAROLLI, M. A. Observação sobre a alimentação e a sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei*, Berg, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 63-68, 1987.
- BENGTSON, D. A. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. In: FISH & CRUSTACEANS LARVICULTURE SYMPOSIUM. Edited by Edited by LAVENS P.; SORGELOOS, P.; JASPERS, E.; OLLEVIER, F. **European Aquaculture Society**, Gent, Belgium, p. 142-143, 1991.
- BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura**: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 129 p.
- CAHU, C.; ZAMBONINO INFANTE, J. L.. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, p.161-180, 2001.
- CESTAROLLI, M. A.; PORTELLA, M. C. Larvicultura de peixes uma abordagem em escala piloto. **Comum. Pesqui. Agropec.**, São Paulo, n. 12, v. 2, p. 28-29, 1994.
- DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present "state of art" and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 24, n. 6, p. 807-833, 1984.
- DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, New York, v. 42, p. 495-506, 1978.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture – SOFIA 2004**. Rome. Italy, 2005. Disponível em: http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm. Acesso em 01 agosto 2005.

GUERRERO, C. E. A. **Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma coruscans*: sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos**. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

JOMORI, R. K. **Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial**. 1999. 70 f. (Trabalho de graduação em Zootecnia.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 243, p. 175-183, 2005.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, p. 181-2001.

LAZO, J. P.; DINIS, M. T.; HOLT, G. J.; FAULK, C.; ARNOLD, C. R. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 188, p. 339-351, 2000.

MACEDO-VIEGAS, E.M.; PORTELLA, M.C.; CARNEIRO, D.J. Utilization of fish protein hydrolysate in artificial diets for pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Journal of Applied Aquaculture**, Frankfort, v.14, n.1/2., p.101-112, 2003.

MEEREN, T. Selective feeding and prediction of food consumption in trubot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) reared on the rotifer *Brachionus plicatilis* and natural zooplankton. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 93, p. 35-55, 1991.

NAEGEL, L. C. A. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. **Aquacultural Engineering**, Londres, v. 21, p. 49-59, 1999.

PERSON LE-RUYET, J. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. **Advance Tropical Aquaculture**, v. 9, p. 625-42, 1989.

PORTELLA, M. C.; CARNEIRO, D. J.; RAZZANTE, C. Desenvolvimento e sobrevivência de larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*), após substituição do alimento vivo pelo artificial. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13, ENCONTRO BRASILEIRO DE GRUPOS DE PESQUISAS DE PEIXES EM ESTUÁRIO, 1, 1999. Universidade Federal de São Carlos. Anais...p.533, 1999.

QUEIROZ, F. J.; LOURENÇO, J. N.; KITAMURA, P.; SCORVO FILHO, J. D.; CYRINO, J.E.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.; BERNARDINHO, G. Aqualculture in Brazil: Research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture**, Baton Rouge, v. 36, n. 1, p. 45-50. 2005.

RUST, M., B.; HARDY, R. W.; STICKNEY, R. R. A new method for force-feeding larval fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 116, p. 341-352, 1993.

SALLES, F. A. **Aspectos técnicos e econômicos da larvicultura intensiva do curimatá (*Prochilodus scrofa*) em escala massal**. 1998. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

TANDLER A.; KOLKOVSKI, S. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the sucessful use of microdiets in *Sparus aurata* larval rearing. In: FISH & CRUSTACEANS LARVICULTURE SYMPOSIUM. Edited by LAVENS P.; SORGELOOS, P.; JASPERS, E.; OLLEVIER, F. **European Aquaculture Society**, Gent, Belgium, p. 169-171, 1991.

TESSER. M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA. M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated. **Journal of Applied Aquaculture**, v. Frankfort, v.17, n. 2, p. 47-59, 2005.

WATANABE T.; KIRON, V. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124, p. 223-251,1994.

CAPÍTULO I

Desenvolvimento do trato digestório e desempenho de larvas de pacu *Piaractus*

mesopotamicus alimentadas com náuplios *Artemia* e plâncton natural

Resumo - A utilização de organismos vivos na larvicultura de muitas espécies de peixes é prática indispensável para garantia do crescimento inicial e sobrevivência. Dessa forma, larvas de pacu, com cinco dias após a eclosão (médias de 5,2mm e 0,46mg de comprimento total e peso, respectivamente), foram alimentadas com náuplios de *Artemia* ou plâncton natural, com o objetivo de avaliar os efeitos desses alimentos no crescimento e sobrevivência das larvas, bem como no desenvolvimento do sistema digestório dos animais durante os primeiros 15 dias após o início da alimentação exógena. As larvas foram estocadas numa densidade de 10 larvas.L⁻¹, em unidades experimentais contendo 6 L de água cada, considerando 10 réplicas experimentais para cada tratamento. Os principais organismos constituintes do plâncton natural foram os rotíferos e copépodos na fase de náuplios. Cladóceros, copepoditos e copépodos adultos foram observados principalmente nos dias finais do experimento. Os maiores valores médios para o crescimento, em comprimento e peso, foram obtidos com a alimentação à base de náuplios de *Artemia*. As taxas de crescimento específico das larvas que receberam o plâncton, avaliadas a cada três dias, no geral foram menores que as obtidas com a *Artemia* e variaram bastante de acordo com os organismos planctônicos predominantes em cada período. Na última amostragem, com um aumento da quantidade de cladóceros, a taxa de crescimento específico nesse tratamento foi o dobro da obtida com os náuplios de *Artemia*. Apesar das diferenças no crescimento, as taxas de sobrevivência foram semelhantes ($P>0,05$) entre os tratamentos, que variaram de 79 a 88% para as alimentações com o plâncton e *Artemia*, respectivamente. Ao final de 15 dias, larvas de pacu que receberam náuplios de *Artemia* mostraram-se numa fase mais avançada do desenvolvimento do trato digestório que as alimentadas com o plâncton natural. As diferenças no crescimento e desenvolvimento entre os tratamentos foram bastante evidentes, e a composição planctônica, na maior parte do tempo composta por organismos menores como rotíferos e náuplios de copépodos, não propiciaram um crescimento adequado às larvas de pacu.

Palavras-chaves: *Artemia* náuplios

Palavras-chaves: Náuplios de *Artemia*, plâncton natural, larvas de peixes, pacu *Piaractus mesopotamicus*

Digestive tract development and performance of pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae fed *Artemia* nauplii and natural plancton

Abstract - The use of living organisms in larviculture of many fish species is an indispensable practice to ensure initial growth and survival. Thus, 5-day old pacu larvae (means of 5.2mm and 0.46mg total length and weight, respectively) were fed either *Artemia* nauplii or natural plancton, in order to evaluate the effects of those feeds on larval growth and survival, as well as development of the animals digestive system during the first 15 days after the onset of exogenous feeding. Larvae were maintained at a density of 10 larvae.L⁻¹, in experimental units containing 6 L water each, considering 10 experimental replicates for each treatment. The main organisms constituting the natural plancton were rotifers and copepods at the nauplii stage. Adult cladocerans, copepodites, and copepods were observed especially at the final days of the experiment. The highest mean values for growth, both in length and weight, were obtained when feeding consisted of *Artemia* nauplii. The specific growth rates of larvae that received plancton, evaluated at every three days, were in general smaller than those obtained with *Artemia* and varied considerably according to the plancton organisms predominant during each period. As the number of cladocerans increased in the last sampling, the specific growth rate in that treatment was twice as high as the rate obtained with *Artemia* nauplii. Contrary to growth results, the survival rates were similar ($P>0.05$) between treatments, ranging from 79 to 88% for plancton or *Artemia* feeding, respectively. At the end of the 15-day rearing, pacu larvae receiving *Artemia* nauplii were at a more advanced stage of digestive tract development than those fed natural plancton. Differences were quite evident, and plancton composition, most of the time consisting of smaller organisms such as rotifers and copepod nauplii, did not provide suitable pacu larvae growth.

Key words: *Artemia* nauplii, natural plankton, fish larvae, pacu, *Piaractus mesopotamicus*,

1. Introdução

Larvas de muitas espécies de peixes marinhos e de água doce, denominadas de *altriciais* por Alliot apud Rust et al. (1993), não possuem o sistema digestório completamente formado e funcional quando iniciam a alimentação exógena (DABROWSKI, 1984; KOLKOVSKI, 2001), marcando o começo de uma fase crítica para sua sobrevivência. Estudos sobre alimentação inicial de larvas altriciais mostram que o procedimento mais adequado para superar esse período crítico é o fornecimento de organismos vivos (PERSON LE RUYET, 1989; BENGSTON, 1991; TANDLER e KOLKOVSKI, 1991), que além de possuírem os nutrientes essenciais como proteínas, aminoácidos livres, ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas, também contém substâncias necessárias à metamorfose das larvas (FLÜCHTER, 1982). Segundo PERSON LE RUYET et al., 1993, os produtos da autólise dos organismos vivos podem agir na estimulação da secreção de tripsinogênio do pâncreas para o intestino e ou na atividade dos zimogênios presente no intestino do animal.

No Brasil, manejos e protocolos de alimentação inicial viáveis e produtivos ainda não estão claramente definidos para larvas de muitas das espécies nativas. A utilização de viveiros previamente adubados para a obtenção de organismos zooplanctônicos e a criação das larvas nesses ambientes tão logo iniciam a alimentação exógena é uma das práticas mais utilizadas para a larvicultura das espécies nativas. No entanto, baixos índices e variabilidade na produção nesse sistema de criação têm sido mencionados (BASILE-MARTINS et al., 1987; CHABALIN et al., 1989; CESTAROLLI e PORTELLA, 1994).

Alternativamente, a criação das larvas por um período inicial sob condições laboratoriais, antes de serem transferidas para os viveiros externos, tem sido sugerida como uma opção para a elevação dos índices de produção na larvicultura (CESTAROLLI e PORTELLA, 1994). Vantagens produtivas e econômicas dessa técnica de criação em relação à semi-intensiva foram verificadas com larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, que também dependem inicialmente do alimento vivo (JOMORI et al., 2003; JOMORI et al., 2005).

Em laboratório, os náuplios de *Artemia* têm sido os organismos vivos mais utilizados para a criação de larvas de peixes e camarões (NAEGEL, 1999). Essa preferência pela *Artemia* em relação aos outros organismos tem sido motivada pela disponibilidade dos cistos (STØTTRUP e NORSKER, 1997), facilmente comercializados no mercado internacional. No entanto, alguns inconvenientes também têm sido relatados, tais como a qualidade nutricional, que varia de acordo com o local geográfico de coleta, a dependência da disponibilidade dos cistos no mercado, a possibilidade dos cistos carregarem contaminantes como pesticidas (KLEIN-MAC PHEE et al., 1980) e patógenos (HART e PURSER, 1996) e o alto custo para a sua aquisição (LAVENS e SORGELOOS, 1998).

Alternativamente ao uso da *Artemia*, outra estratégia alimentar sugerida para a criação das larvas em laboratório é o fornecimento do plâncton natural coletado dos viveiros (MEEREN, 1991a). O plâncton natural em viveiros pode ser obtido através do emprego de técnicas de fertilização (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983), mas, em contrapartida, alguns problemas são associados ao plâncton, como a instabilidade natural das populações que rapidamente diminuem após o pico de ocorrência (JANA, 1997), a influência e dependência das condições climáticas na produção planctônica (CESTAROLLI et al., 1997), além da existência de animais potencialmente predadores como ninfa de Odonata (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983), e até mesmo organismos zooplânctônicos como algumas espécies de copépoda ciclopóida (FERREIRA e SENHORINI, 1986; FREGADOLLI, 2003), que são responsáveis por perdas significativas na produção.

O pacu *Piaractus mesopotamicus*, espécie bastante estudada e de grande interesse comercial, possui larvas caracteristicamente altriciais, que dependem da disponibilidade de organismos vivos nos primeiros dias da alimentação exógena para a garantia do seu desenvolvimento inicial, crescimento e sobrevivência. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a utilização de organismos zooplânctônicos, coletados em viveiros fertilizados, e náuplios de *Artemia* como alimentos iniciais para larvas de pacu quando criados intensivamente sob condições laboratoriais.

2. Material e Métodos

Instalações e condições experimentais gerais

Larvas com cinco dias de vida, iniciando a alimentação exógena, foram estocadas numa densidade de 10 larvas.L⁻¹, em 20 unidades experimentais contendo 6 litros de água, sendo 10 repetições para cada tratamento. Em ambos tratamentos, plâncton natural ou náuplios de *Artemia*, as larvas foram alimentadas quatro vezes ao dia, em quantidades diárias de 500 organismos.larva⁻¹ nos seis primeiros dias da criação, 1000 organismos.larva⁻¹ do sétimo ao nono dia e 1500 organismos.larva⁻¹ até o final (15 dias de alimentação).

O plâncton natural foi obtido diariamente nos viveiros externos, com uma rede coletora de plâncton de 68 µm de abertura de malha. Os viveiros foram previamente fertilizados com esterco de aves poedeiras e, posteriormente, receberam uma adubação suplementar, a cada seis dias após o início do experimento. O plâncton coletado era peneirado em malha com cerca de 0,3mm para retirada de organismos maiores indesejáveis (insetos adultos e suas larvas) e concentrado em um recipiente com volume conhecido. Desse concentrado, eram retiradas três alíquotas de 1mL para estimativa da quantidade de organismos presentes, realizada sob microscópio estereoscópico com pipeta de 1mL, e calculado o volume necessário para a alimentação das larvas. Diariamente, amostras (n=3) do concentrado de zooplâncton foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 4% para avaliação qualitativa, através da classificação dos organismos em cinco categoriais: rotíferos, náuplios de copépodos, copepoditos, copépodos adultos e cladóceros. Para a determinação qualitativa do zooplâncton, de cada amostra coletada, foram analisadas três alíquotas em câmara de Sedgewick-Rafter.

Diariamente, pela manhã e a tarde, foram monitorados a temperatura, que apresentou médias que variaram de 29 a 30,2 °C entre manhã e tarde e, periodicamente, o oxigênio dissolvido, pH e condutividade, cujos valores médios foram de 6 ± 0,45 mg/L, 8,1 ± 0,5 e 182 ± 1,6 µS/cm, respectivamente. A água utilizada nas unidades experimentais



provinha de poço artesiano e, diariamente, os resíduos acumulados no fundo dos tanques eram removidos por sifonamento.

Tendo em vista a grande quantidade de copépodos adultos presente nos viveiros de coleta do plâncton, um outro ensaio (experimento II) foi realizado mantendo-se as mesmas condições de criação e tratamentos alimentares, com o propósito de avaliar o impacto da presença desses organismos zooplanctônicos na sobrevivência das larvas. Nesse experimento alterou-se apenas o procedimento para a obtenção do concentrado de zooplâncton, o qual era filtrado em peneira de malha superior (0,5 a 0,6mm) para permitir a passagem desses organismos maiores (copépodos adultos). Nesse segundo experimento, foram avaliadas as taxas de sobrevivência para serem comparadas com as obtidas no experimento anterior (experimento I).

Avaliação do desempenho de crescimento e sobrevivência das larvas

O acompanhamento do crescimento foi realizado a cada três dias, coletando-se cerca de 10% do total de larvas por tratamento. Para avaliação do comprimento total das larvas, utilizou-se paquímetro digital e, para as larvas menores que 10 mm, a medida foi realizada sob microscópio estereoscópico. O peso dos animais foi determinado em balança analítica. Ao final do experimento também foram determinadas as taxas de sobrevivência, em cada réplica experimental.

A partir dos dados biométricos também foi calculada a taxa de crescimento específico (TCE), pela seguinte fórmula: $TCE = (\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial}) \times 100 / \text{intervalo de tempo (dias)}$ entre biometrias (KESTMONTS e STALMANS, 1992).

Para a análise estatística considerou-se um delineamento inteiramente casualizado, num esquema com parcelas subdivididas no tempo, tendo os dois alimentos (plâncton ou náuplios de *Artemia*) como tratamentos principais e os períodos de avaliação como os secundários (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias), com 10 repetições de cada.

Os resultados de peso, comprimento total e sobrevivência foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância Paramétrica (ANOVA), pelo teste F de

Fischer-Snedecor (ZAR, 1998), considerando-se os resultados médios das réplicas de cada parcela experimental. Para os resultados que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$), as médias foram estudadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todas as variáveis biométricas foram avaliadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Bartlett).

Os dados de sobrevivência foram transformados $y = \arcsen \sqrt{x/100}$, sendo x o valor da sobrevivência em porcentagem. Todas as análises e transformações foram efetuadas através de programa SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, version 6.12, 1999).

Avaliação histológica do trato digestório das larvas

Amostras de larvas foram coletadas ao longo do experimento, simultaneamente às coletas para as avaliações do crescimento. Os animais foram fixados em formol a 10% tamponado, por 24 horas e, em seguida, preservados em álcool a 70%.

Para a caracterização da morfologia do aparelho digestório de larvas de pacu ($n = 3$), estas foram incluídas em Historesin® (Leica-Germany). As larvas fixadas foram submetidas ao processo de pré-infiltração com solução de glicol-metacrilato e ativador (embedding kit - Leica) e etanol a 80 % em diferentes concentrações (1:3, 1:1, 3:1 v/v), durante 3 horas. Em seguida, o material foi embebido em glicol-metacrilato (mescla de infiltração) durante 1 hora.

Posteriormente, o material foi incluído em solução de pré-inclusão (glicol-metacrilato + ativador) com endurecedor, em molde histológico. Após endurecimento parcial da solução, os blocos foram colocados em estufa à temperatura de 45 °C por aproximadamente 72 horas, para a polimerização e endurecimento total. Cortes histológicos de três micrômetros de espessura foram obtidos com a utilização de navalhas de vidro e posteriormente corados com Azul de Toluidina a 1% (AT) e Fucsina básica a 0,5 % (FUC).

3. Resultados

Desempenho e sobrevivência das larvas e desenvolvimento morfológico do trato digestório

Os resultados das análises estatísticas pelo teste F mostraram efeitos significativos ($P < 0,01$) tanto para o comprimento como para o peso. As maiores médias de comprimento e peso (Tabelas 1 e 2) foram obtidas com a alimentação à base de náuplios de *Artemia*, em todos os períodos avaliados ($P < 0,05$).

Melhores resultados com náuplios de *Artemia* também foram observados na avaliação do crescimento das larvas ao longo do tempo. Enquanto os náuplios de *Artemia* propiciavam às larvas um crescimento gradual e contínuo ao longo dos 15 dias de avaliação, o plâncton natural condicionou o crescimento com outro ritmo, no qual só foram detectados ganhos significativos em comprimento e peso ($P < 0,05$) no nono dia em diante.

Tabela 1 - Valores médios de comprimento total (mm) das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* criadas com diferentes tipos de alimento vivo.

Tratamentos	Dias após o início da alimentação exógena					
	0 *	3	6	9	12	15
Náuplios de <i>Artemia</i>	5,2±0,1 ^{Aa}	5,9±0,2 ^{Ba}	7,2±0,3 ^{Ca}	9,2±0,6 ^{Da}	10,6±0,4 ^{Ea}	12,5±0,2 ^{Fa}
Plâncton natural	5,2±0,1 ^{Aa}	5,4±0,3 ^{Ab}	5,7±0,1 ^{Ab}	6,4±0,3 ^{Bb}	7,3±0,2 ^{Cb}	10,4±0,4 ^{Db}

Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na horizontal e minúscula na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

* Valores médios referentes à biometria inicial

Tabela 2 - Valores médios de peso (mg) das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* criadas com diferentes tipos de alimento vivo.

Tratamentos	Dias após o início da alimentação exógena					
	0 *	3	6	9	12	15
Náuplios de <i>Artemia</i>	0,5±0,1 ^{Aa}	0,9±0,10 ^{Ba}	1,7±0,32 ^{Ca}	3,9±0,7 ^{Da}	7,4±1,2 ^{Ea}	15,0±2,0 ^{Fa}
Plâncton natural	0,5±0,1 ^{Aa}	0,5±0,1 ^{Ab}	0,6±0,1 ^{Ab}	1,0±0,2 ^{Bb}	1,9±0,2 ^{Cb}	7,3±0,9 ^{Db}

Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na horizontal e minúscula na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

* Valores médios referentes a biometria inicial

O efeito da fonte alimentar no ritmo de crescimento das larvas ficou bastante evidenciado pelas taxas de crescimento específico (Figura 1). Os valores revelaram médias semelhantes ao longo do tempo ($P > 0,05$) para as larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* (~ 20 a 27%) e taxas que oscilaram em cerca de 3 a 45% nas larvas que receberam o plâncton natural.

As larvas alimentadas com o plâncton natural também sofreram um atraso no desenvolvimento do trato digestório, principalmente quanto a formação do estômago. Doze dias após início da alimentação exógena, as larvas que receberam náuplios de *Artemia* (~7mg) ou plâncton natural (~2mg) apresentavam o estômago em início da formação, com algumas glândulas gástricas já aparentes (Figura 2A e 3A).

Posteriormente, na amostragem realizada aos 15 dias, as larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* (~15mg) já apresentavam o estômago formado em regiões distintas, a cárdica e a pilórica (Figura 2B). A primeira, caracterizando a região glandular, apresentou na mucosa um epitélio cilíndrico simples e alto, com glândulas gástricas ocorrendo abaixo desse epitélio; e a segunda apresentou a mucosa constituída por um epitélio cilíndrico simples baixo, sem glândulas gástricas, caracterizando a região aglandular do estômago. Nesse mesmo período, larvas alimentadas com o plâncton natural (~7mg) apresentaram o

estômago num desenvolvido mais avançado que na amostragem do período anterior, com maior quantidade de glândulas gástricas, mas ainda sem a formação das duas regiões distintas (Figura 3B). No intestino observaram-se características mais semelhantes entre os dois tratamentos, com a formação de vilosidades e com células caliciformes aparentes (Figuras 4A e 4B). Entretanto, os enterócitos dos animais que receberam *Artemia* apresentavam maior quantidade de inclusões supranucleares e células caliciformes.

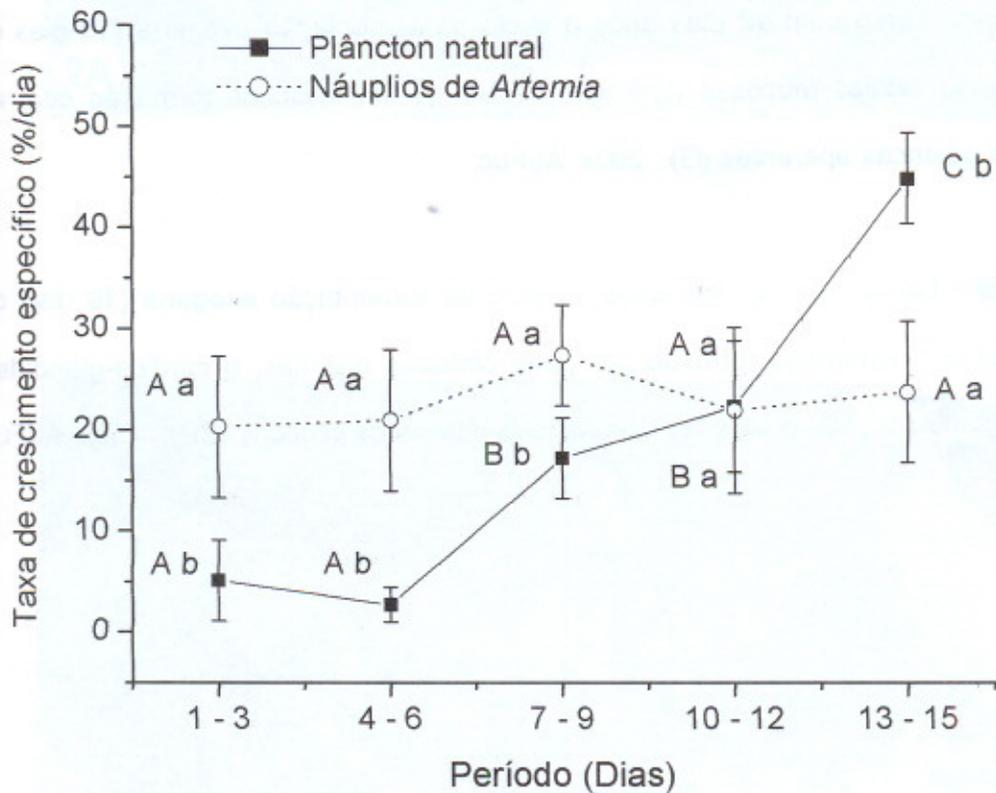


Figura 1. Valores médios das taxas de crescimento específico de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentadas com plâncton natural ou náuplios de *Artemia* durante 15 dias. Médias seguidas de mesma letra (maiúscula para a comparação na horizontal e minúscula na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Figura 2 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentadas com náuplios de *Artemia*.

Figura 2A – Larva com 12 dias após o início da alimentação exógena (16 dias de vida) evidenciando células mucosas (CM) e o estômago em início de formação com algumas glândulas gástricas aparentes (G). 200x. At/Fuc.

Figura 2B - Larva com 15 dias após o início da alimentação exógena (19 dias de vida) evidenciando o estômago formado por duas câmaras distintas, a cárdica-glandular (G) e pilórica-aglandular (AG) e secções transversais dos cecos pilóricos (CP). 100x. At/Fuc.

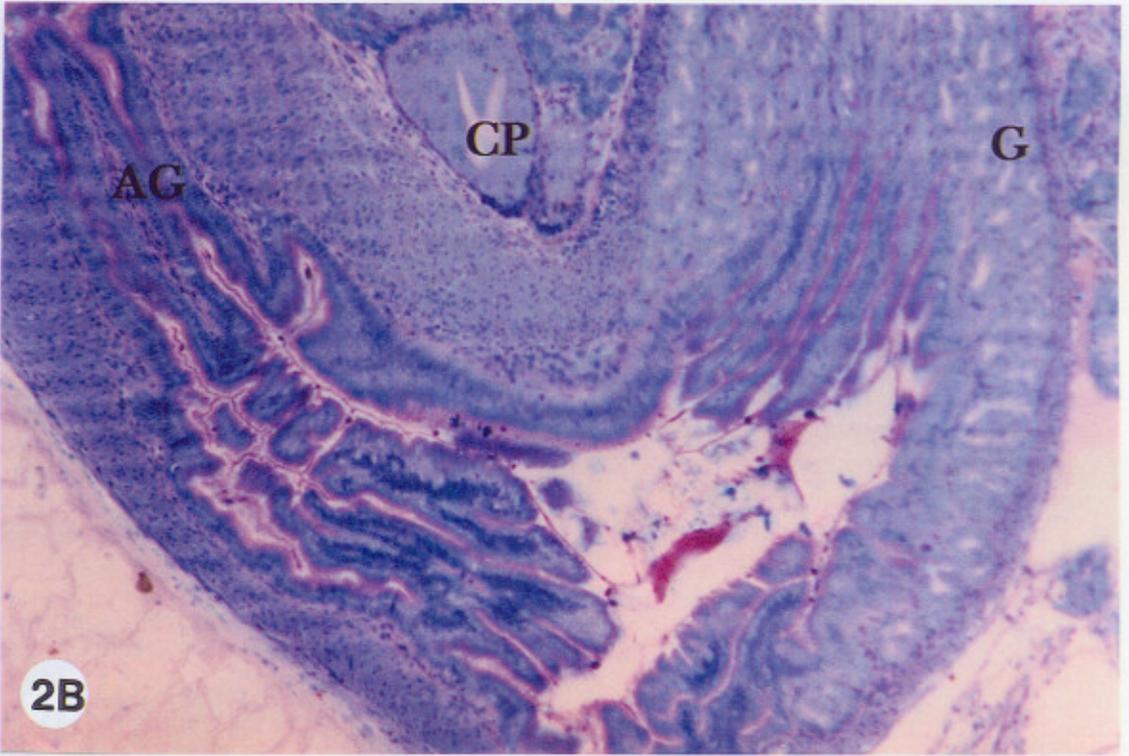
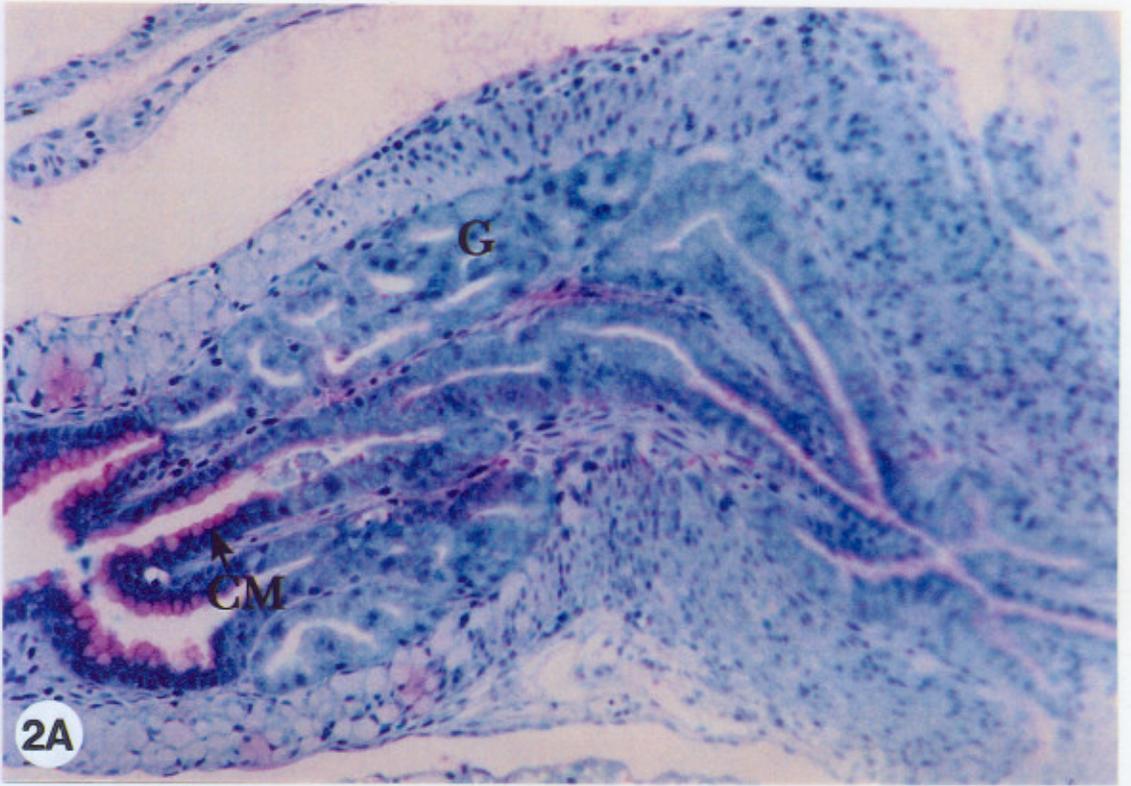


Figura 3 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentadas com plâncton natural.

Figura 3A – Larva com 12 dias após o início da alimentação exógena (16 dias de vida) evidenciando células mucosas (CM), pâncreas (P) e o estômago em início de formação com algumas glândulas gástricas aparentes (GG). 200x. At/Fuc.

Figura 3B - Larva com 15 dias após o início da alimentação exógena (19 dias de vida) evidenciando células mucosas (CM), e estômago em formação com presença de glândulas gástricas (GG). 100x. At/Fuc.

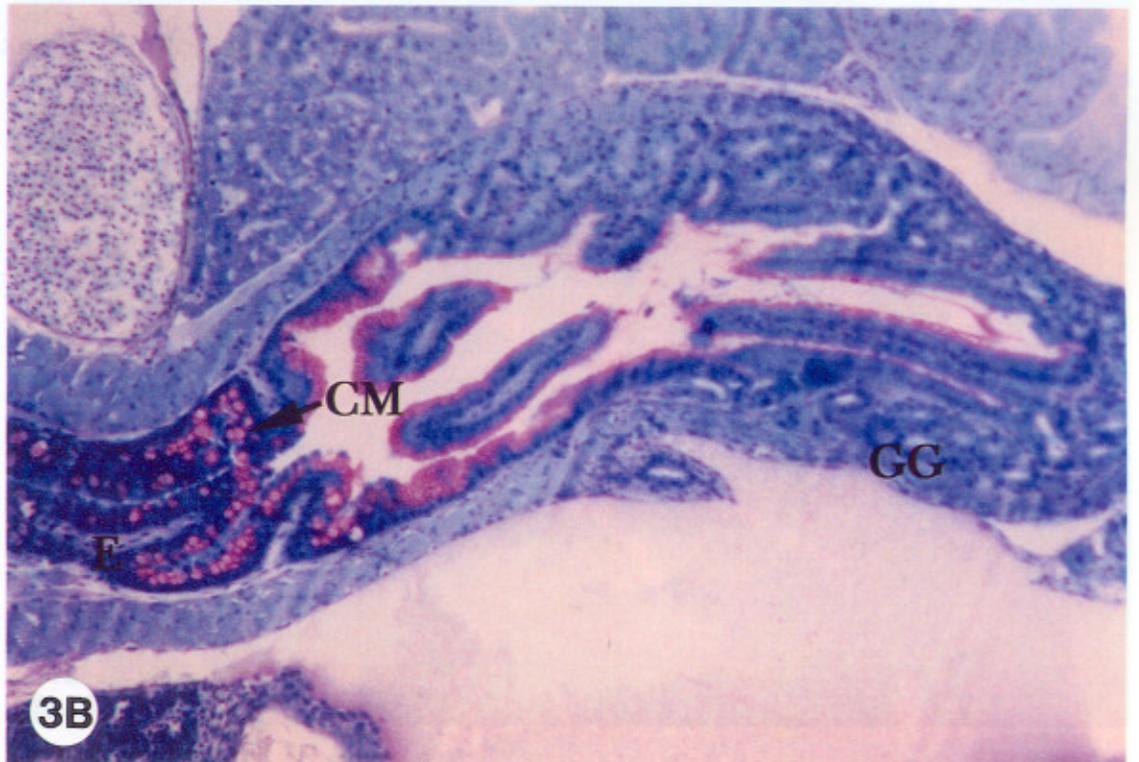
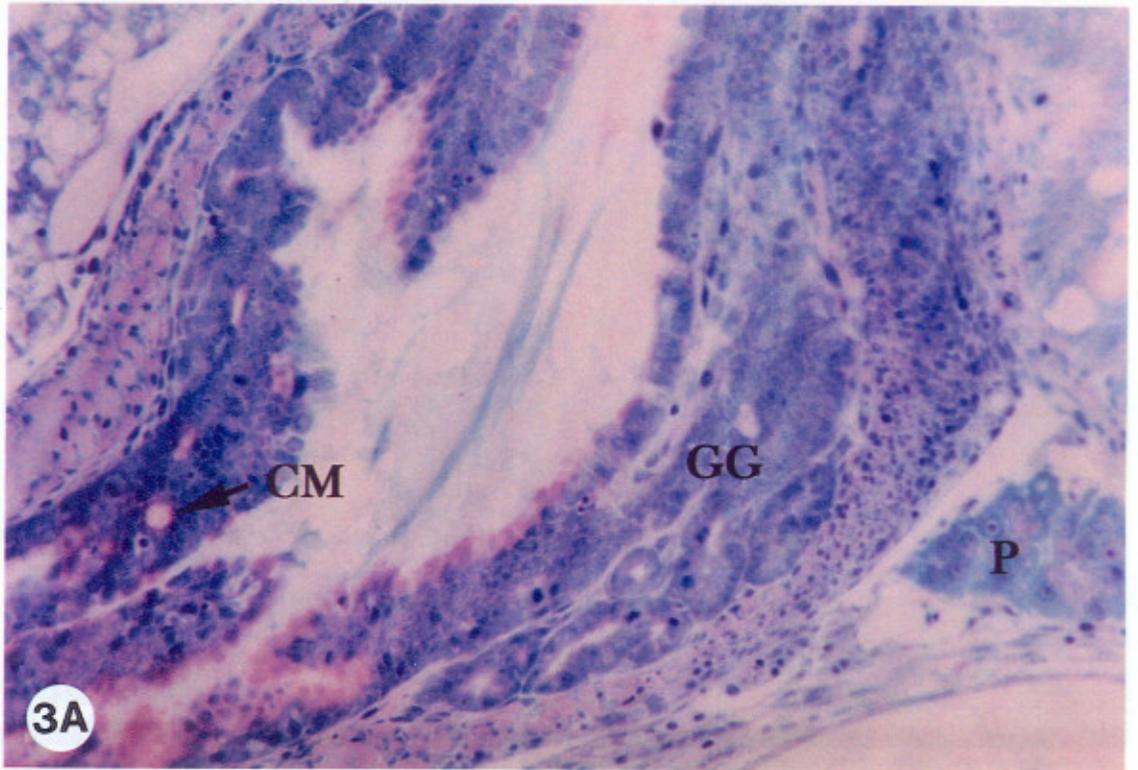
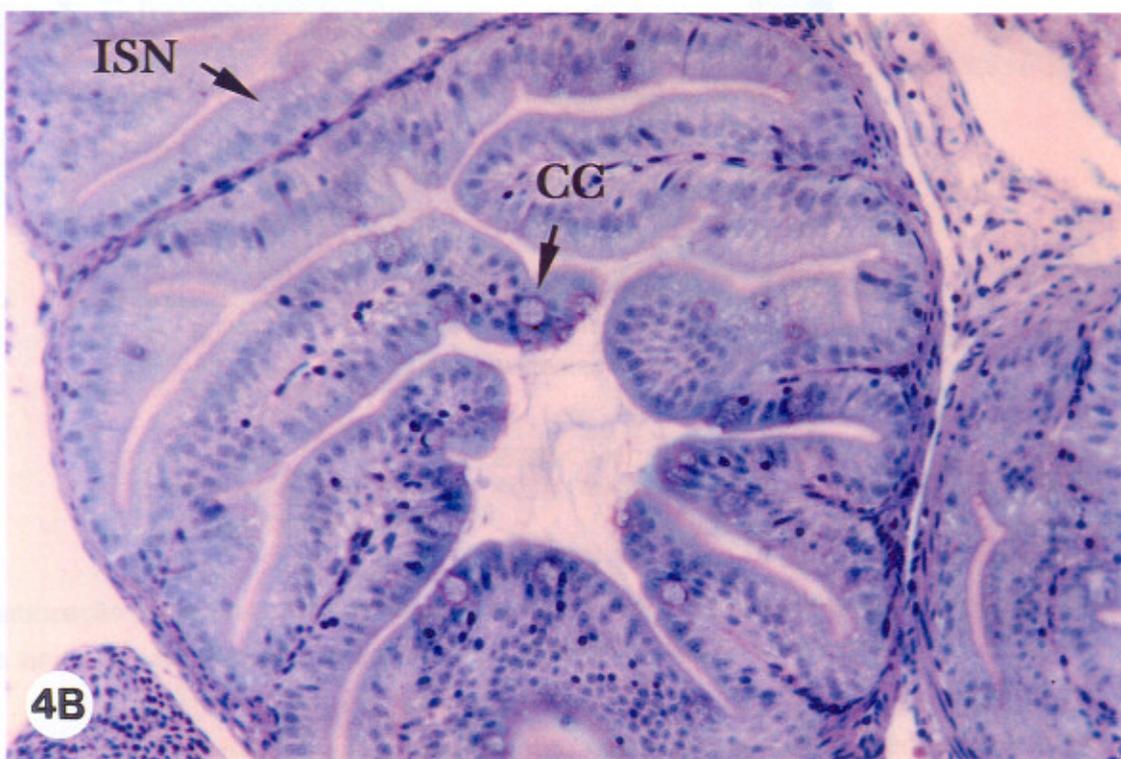
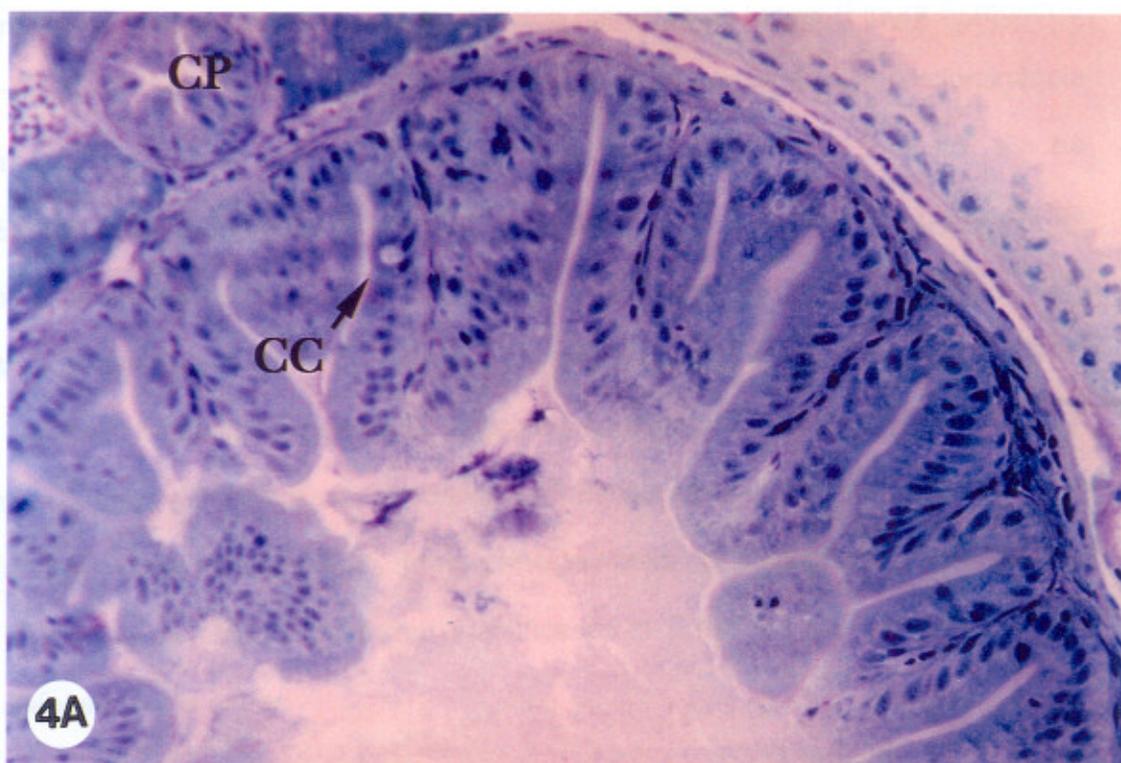


Figura 4 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* aos 15 dias após o início da alimentação exógena (19 dias de vida)

Figura 4 A - Larva alimentada com plâncton natural evidenciando as vilosidades no intestino anterior com células caliciformes (CC) e cecos pilóricos em secção transversal (CP). 200x. At/Fuc.

Figura 4 B - Larva alimentada com náuplios de *Artemia* evidenciando as vilosidades no intestino com células caliciformes (CC) e inclusões supranucleares (ISN). 200x. At/Fuc.



A análise qualitativa das amostras de plâncton oferecido às larvas (Figura 5) mostrou uma maior ocorrência de rotíferos e copépodos em estágio de náuplios, com predominância intercalada entre os dois grupos ao longo do experimento. Entre o 13º e 15º dia de alimentação, um relativo aumento da população de cladóceros e copépodos na forma de copepoditos foi observado.

Entre os animais do grupo Rotífera, as principais espécies observadas foram *Keratella tropica*, *Keratella americana*, *Brachionus falcatus*, *Brachionus dolabratus*, *Epiphanes macrourus* e *Trichocerca cylindrica*. Em relação aos copépodos, predominaram tanto ciclopóidas como calanoidas, mas principalmente o ciclopóida *Termocyclops decipiens*. Já entre os cladóceros foram identificadas a presença das espécies *Moina micrura* e *Diaphanosoma birgei*.

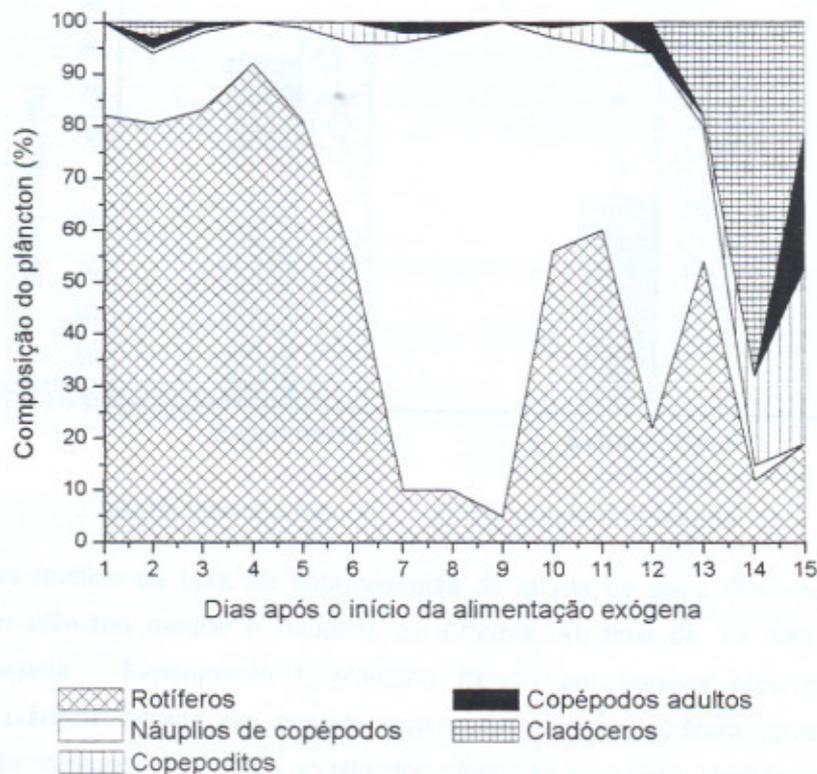


Figura 5. Participação percentual média dos organismos zooplantônicos na composição do plâncton oferecido às larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, durante 15 dias de alimentação.

Ao contrário dos resultados de crescimento, as taxas de sobrevivência das larvas não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos, cujas médias

foram de $79,1 \pm 10,2\%$ e $88,3 \pm 10,9\%$, para larvas alimentadas com plâncton e náuplios de *Artemia*, respectivamente.

Comparando as taxas de sobrevivência desse experimento (I) com as obtidas no experimento II, uma drástica diminuição na taxa de sobrevivência foi constatada no tratamento em que as larvas receberam o plâncton natural (Figura 6). Além de menores taxas de sobrevivência ($49,6 \pm 11,4\%$) obtidas no tratamento que recebeu o plâncton filtrado em malha superior, em duas repetições verificou-se a ocorrência de mortalidade total. Um fato que chamou a atenção nesse tratamento foi a observação de larvas mortas com o corpo parcialmente lesado ou larvas interiormente "secas", como se tivessem sido totalmente consumidas.

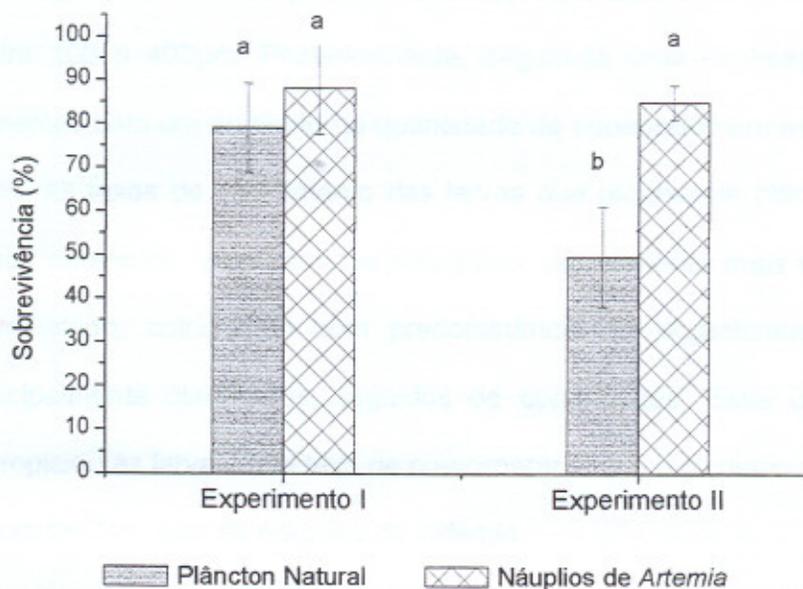


Figura 6. Valores médios da taxa de sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentadas com plâncton natural e náuplios de *Artemia*, ao final de 15 dias após o início da alimentação exógena. Experimento I: plâncton filtrado em peneira com malha de 0,3mm; Experimento II: plâncton filtrado em peneira com malha superior, 0,5mm (grande ocorrência de fêmeas adultas de copépoda ciclopóida no plâncton oferecido às larvas). Médias seguidas de mesma letra, em cada experimento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Grande parte da mortalidade ocorreu do quarto ao oitavo dia após o início do experimento. Avaliações qualitativas das amostras do plâncton fornecido nesses dias indicaram que a maior parte dos organismos que constituíam o plâncton era adultos de

copépodos ciclopóida *Thermocyclops decipiens* (principalmente fêmeas), animais considerados predadores de larvas de peixes e de outros organismos zooplanctônicos.

4. Discussão

O crescimento das larvas alimentadas com o plâncton natural sofreu variações conforme a sua composição. Correlacionando as taxas de crescimento específico diário dessas larvas com a ocorrência dos organismos planctônicos predominantes ao longo do tempo, verificaram-se baixos valores para as taxas de crescimento nos seis primeiros dias, tanto em relação aos períodos subsequentes como em relação às larvas que receberam náuplios de *Artemia*. Nesse período, o plâncton oferecido era composto principalmente por rotíferos, que segundo Alvarez-Lajonchère e Molejón,(1998) são organismos de pequeno tamanho, entre 100 a 400µm. Posteriormente, seguiu-se uma diminuição da frequência desses organismos com um aumento na quantidade de copépodos em estágio de náuplios. Nesse período, as taxas de crescimento das larvas que receberam plâncton aumentaram em relação aos anteriores, e na última amostragem, um aumento mais pronunciado ainda pôde ser constatado, coincidindo com predominância de organismos zooplanctônicos maiores, principalmente cladóceros, seguidos de copepoditos. Essa última composição planctônica propiciou às larvas uma taxa de crescimento específico diário da ordem de 45%, contra uma taxa de 24% com os náuplios de *Artemia*.

Um dos fatores que pode estar relacionado com essa interação dos organismos vivos na dinâmica do crescimento das larvas foi a variação no tamanho dos organismos que compunham o plâncton. Segundo Hoff e Snell (1987), uma espécie de Cladóceras como a *Moina* na fase adulta, que pode medir de 700 a 1500 µm, é maior que o náuplio de *Artemia* (400 a 500 µm) e é aproximadamente, de três a cinco vezes maior que um rotífero adulto. Para muitas espécies de peixes marinhos, os rotíferos são extremamente necessários para o crescimento e desenvolvimento inicial das larvas, pois apresentam tamanho, forma e velocidade de movimento adequados bem como o valor nutricional (LUBZENS, 1981). Para

outras, como "golden snapper" *Lutjanus johnii*, o fornecimento de pequenos rotíferos como primeiro alimento causou a mortalidade total das larvas num período similar ao das larvas mantidas em jejum (SCHIPP et al., 1999).

Estudos sobre a seletividade alimentar de larvas de pacu e tambaqui *Colossoma macropomum* mostraram maior preferência dessas larvas por cladóceros desde as primeiras alimentações (FREGADOLLI, 1993; SIPAÚBA-TAVARES, 1993). Fregadolli (1993) verificou que presas menores e de movimentos mais lentos, como os rotíferos e náuplios de copépodos, foram pouco selecionados pelas larvas pacu e tambaqui, e em apenas duas situações o autor constatou uma maior seletividade por náuplios e rotíferos: como presas alternativas pela pouca disponibilidade de cladóceros e pelas larvas menores devido a sua ineficiência na captura dos cladóceros. Entre as espécies de cladóceros, Fregadolli (1993) ainda observou que as larvas selecionaram preferencialmente *Moina micrura* e *Diaphanosoma birgei*, e rejeitaram outras espécies (*Bosmina hagmanni*, *Bosminopsis deitersi*, etc.).

Os náuplios de *Artemia* propiciaram um melhor crescimento final em relação ao plâncton natural provavelmente pela homogeneidade dos itens alimentares fornecidos por todo o período. Boas respostas de crescimento e sobrevivência têm sido obtidas com a utilização de náuplios de *Artemia* na criação das larvas de várias espécies nativas neotropicais (PORTELLA et al., 1999, GUERRERO, 2003; LUZ, 2004; TAKATA, 2004). Olsen et al. (2000) comentaram que a utilização do zooplâncton coletado a partir de viveiros fertilizados pode ser um procedimento que restringe a produção de juvenis pela impossibilidade de controle total das espécies que constituem o plâncton, o tamanho e o valor nutricional, além da contaminação pela introdução de patógenos nocivos às larvas. No entanto, vale ressaltar que, no último período quando houve uma maior predominância de cladóceros, a taxa de crescimento específico das larvas alimentadas com o plâncton foi praticamente o dobro da taxa proporcionada pelos náuplios de *Artemia*.

Para algumas outras espécies, os náuplios de *Artemia* nem sempre tem se revelado como a melhor opção. Larvas de *Hippoglossus hippoglossus* apresentaram melhor

desenvolvimento (i.e. processos de ossificação, migração completa dos olhos e pigmentação) quando alimentadas com zooplâncton em comparação com a *Artemia*, mesmo não havendo diferenças nas respostas de crescimento e sobrevivência (HAMRE et al., 2002; SAELE et al., 2003). Segundo os autores, os motivos pelos quais a *Artemia* ficou em desvantagem em relação ao plâncton natural foram o tamanho da *Artemia* que, com o crescimento das larvas, tornaram-se presas de pequeno tamanho em relação ao que o plâncton pode oferecer e as diferenças nutricionais entre esses alimentos.

Hamre et al. (2002) verificaram que o teor de aminoácidos essenciais (i.e. arginina, metionina, isoleucina e leucina) no "pool" de aminoácidos livres da *Artemia* foi menor que no de zooplâncton (constituído principalmente por copépodos), embora o teor de aminoácidos totais não tenha diferenciado entre as duas fontes. Os copépodos constituem a maior parte da dieta das larvas de peixes em ambientes naturais marinhos e a composição bioquímica desses organismos tem sido considerada como referência nutricional no desenvolvimento de tecnologias para a produção de organismos i.e. *Artemia* e *Brachionus plicatilis* nutricionalmente mais adequados para as larvas (EVJEMO et al. 2003). Paralelamente, técnicas para a produção intensiva de determinadas espécies de copépodos têm sido propostas (SCHIPP et al., 1999).

No presente estudo, a presença de copépodos adultos foi prejudicial, pois os organismos presentes no plâncton eram principalmente ciclopóidas, muito deles considerados carnívoros e predadores potenciais de organismos maiores como larvas de peixes e outros animais zooplânctônicos (cladóceros) causando lesões às presas que resultam na morte das mesmas (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983; FREGADOLLI, 2003). Os copépodos carnívoros agarram-se as larvas arranhando a pele fina ou as nadadeiras das mesmas com seus pés espinhosos, bastando poucos ciclopóides para matar centenas de larvas (FERREIRA e SENHORINI, 1986). Fregadolli (2003) avaliou a predação por copépodos ciclopóidas (*Thermocyclops decipiens*) em larvas de pacu e tambaqui e ilustrou as injúrias causadas por esses organismos, desde lesões nas nadadeiras até o consumo total da larva, restando apenas a sua estrutura esquelética.

Larvas nessas mesmas condições foram observadas no experimento II do presente estudo, quando fêmeas adultas de *Thermocyclops decipiens* eram abundantes. A taxa média de sobrevivência ($49,6 \pm 11,4\%$) nesse tratamento foi 37% menor que no experimento I ($79 \pm 10\%$). As taxas de sobrevivência com a dieta à base de náuplios de *Artemia* nos dois experimentos foram próximas ($88,3 \pm 11\%$ e $85,4 \pm 4\%$, respectivamente), mostrando que as condições experimentais entre os dois ensaios foram semelhantes. Copepoditos em estágio de desenvolvimento mais tardio e fêmeas adultas de *Thermocyclops decipiens* foram constatados por Fregadolli (2003) como os principais responsáveis pelos ataques às larvas.

Faria et al. (2001) também reportaram a predação do copépodo ciclopóida (*Mesocyclops longisetus*) em larvas de pacu, e a intensificação da predação com o aumento da densidade dos copépodos. Na maior densidade testada ($30 \text{ predadores.L}^{-1}$), os autores verificaram sobrevivência de cerca de 55%, próxima à obtida no presente estudo. Muitos dos produtores e técnicos não acreditam na ocorrência de copépodos carnívoros predadores de larvas de peixes em regiões tropicais e pequena importância tem sido dada à análise da composição planctônica nos viveiros para a criação das larvas, bem como são poucos os estudos que reportam esses tipos de copépodos predando larvas de peixes (FREGADOLLI, 2003).

Mesmo não sendo o alimento natural das larvas de pacu, os náuplios de *Artemia* foram uma boa opção para o uso na sua criação intensiva, garantindo o desenvolvimento e crescimento inicial, e boas taxas de sobrevivência. O plâncton natural, em determinado momento, proporcionou taxa de crescimento específico superior ao obtido com os náuplios de *Artemia*, mas na maior parte da criação essas taxas foram menores, como resultado da variação de seus organismos constituintes. Conseqüentemente, ao final de 15 dias após o início da alimentação, as larvas apresentaram médias de peso expressivamente diferentes entre os tratamentos, cerca de 7 e 15mg para plâncton natural e náuplios de *Artemia*, respectivamente.

5. Agradecimentos

Essa alimentação diferenciada em náuplios de *Artemia* ou plâncton natural também influenciou o desenvolvimento do trato digestório dos animais. Larvas que receberam o plâncton natural apresentaram um evidente atraso na ontogenia do trato digestório, principalmente quanto a formação do estômago. Como prática convencional na criação comercial de larvas de pacu, a dieta seca é um alimento usualmente fornecido aos animais. Atrasos no desenvolvimento das larvas podem comprometer a viabilidade dessa prática, uma vez que o sucesso para a utilização da dieta seca depende, dentre outros fatores, do estágio do desenvolvimento larval (PERSON LE RUYET et al., 1993), principalmente o desenvolvimento do estômago e presença de glândulas gástricas. Estudos com larvas da espécie têm mostrado uma melhor eficiência das larvas para o aproveitamento do alimento seco quando essas já possuem pelo menos cerca de 10mg, em função da qualidade da dieta seca utilizada (JOMORI et al., 2005 – capítulo II da presente Tese).

Considerando que a maioria dos produtores de juvenis no Brasil adota o sistema semi-intensivo de larvicultura, estocando as larvas em viveiros tão logo iniciam a alimentação exógena, os resultados do estudo vêm ratificar a importância que deve ser dada ao plâncton nos viveiros. O produtor deve monitorar as respostas dos viveiros às fertilizações e estabelecer o seu próprio programa para esse manejo (OSTRENSKY e BOEGER, 1998), visto que, geralmente, cada viveiro tem a sua particularidade. Na larvicultura, os cuidados necessários para o sucesso no procedimento da fertilização dos viveiros, visando a obtenção de organismos vivos para a alimentação inicial das larvas, não envolvem apenas a avaliação quantitativa da produção planctônica, mas sobretudo a sua composição.

Independentemente do sistema de criação adotado, a garantia de bons resultados produtivos na larvicultura, i.e. desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e saúde das larvas, depende não só da utilização de organismos vivos, mas também de sua disponibilidade apropriada para a espécie.

5. Agradecimentos

O autor agradece à pesquisadora Susana Sendacz, do Instituto de Pesca do Estado de São Paulo, pelo auxílio na identificação dos organismos planctônicos e agradece também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela Bolsa de Estudo de Doutorado e Reserva Técnica concedidas para a execução da pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; MOLEJÓN, O. G. H. Curso sobre reproducción Y larvicultura de peces marinos. In: BRASIL 98: AQUICULTURA, 1998, Recife, 1998. 122p..

BASILE MARTINS, M. A.; YAMANAKA, N.; CESTAROLLI, M. A. Observação sobre a alimentação e a sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei*, Berg, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, n. único, p. 63-68, 1987.

BENGTSON, D. A. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. In: FISH & CRUSTACEANS LARVICULTURE SYMPOSIUM. Edited by Edited by LAVENS P.; SORGELOOS, P.; JASPERS, E.; OLLEVIER, F. **European Aquaculture Society**, Gent, Belgium, p. 142-143, 1991.

CESTAROLLI, M. A.; PORTELLA, M. C. Larvicultura de peixes uma abordagem em escala piloto. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, São Paulo, n. 12, v. 2, p. 28-29, 1994.

CESTAROLLI, M. A.; PORTELLA, M. C.; ROJAS, N. E. T. Efeitos do nível de alimentação e do tipo de alimento na sobrevivência e no desempenho inicial de larvas de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, n. único, 119-29, 1997.

CHABALIN, E.; SENHORINI, J. A.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Estimativa de custo de produção de larvas e alevinos. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 2, n. único, p. 61-74, 1989.

DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present "state of art" and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 24, n. 6, p. 807-833, 1984.

EVJEMO, J. O.; REITAN, K. I.; OLSEN, Y. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) with special emphasis on the nutritional value. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 227, n. 1-4, p. 194-210, 2003.

FARIA, A. C. E. A.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Predação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg) por copépodes ciclopoídes (*Mesocyclops longisetus*, Thiébaud) em



- diferentes densidades e ambientes e com diferentes contrastes visuais. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 497-502, 2001.
- FERREIRA, S.M.G.; SENHORINI, J.A. **Criação de larvas e alevinos**. Pirassununga: Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais. 1986. Apostila.
- FLÜCHTER, J. Substance essential for metamorphosis of fish larvae extracted from *Artemia*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 27, p. 83-85, 1982.
- FREGADOLLI, C. M. Seleção alimentar de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 e tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818, em laboratório. Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, v. 6, p. 1-50. 1993
- FREGADOLLI, C. M. Laboratory analysis of predation by cyclopoid copepods on first-feeding larvae of cultured Brazilian fishes. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 228, n. 1-4, p. 123-140, 2003.
- GUERRERO, C. E. A. **Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1892): sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos**. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- HAMRE, K.; OPSTAD, I.; ESPE, M.; SOLBAKKEN, J.; HEMRE, G. I.; PITTMAN, K. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. *Aquaculture Nutrition*, Oxford, v. 8, p. 139-148, 2002.
- HART, P. R.; PURSER, G. J. Weaning of hatchery-reared greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther) from live to artificial diets: effects of age and duration of the changeover period. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 145, p. 171-181, 1996.
- HOFF, F. H.; SNELL, R. W. **Plankton culture manual**. Ed. Florida Aqua Farms, 1987. 142p.
- JANA, B. B.; CHAKRABARTI, L. Effect of manuring rate on in situ production of zooplankton *Daphnia carinata*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 156, p. 85-89, 1997.
- JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 221, p. 277-287, 2003.
- JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 243, p. 175-183, 2005.

- KESTMONT, P.; STALMANS, J.M. Initial feeding of European minnow larvae, *Phonixus phonixus* L. influence of diet and feeding level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 104, p. 327-340, 1992.
- KLEIN-MC PHEE, G.; HOWELL, H.; BECK, A. D. International study on *Artemia*: nutritional value of live geographical strains of *Artemia* to winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae. In: Edited by PERSOONE, G.; SOGERLOOS, P.; ROELS, O.; JASPERS, E. Universa Press: The brine shrimp *Artemia*. ecology, culturing and use in aquaculture. Wetteren, 1980. p. 18-19.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, p. 181-2001.
- LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Present status and prospects of the use of *Artemia* cysts and biomass in shrimp farming. In: BRASIL 98: AQUICULTURA, 1998. Recife. **Anais...** 1998. v. 1, p. 147-159.
- LUBZENS, E. Rotifer resting eggs and their application to marine aquaculture. **European Mariculture Society**, v. 6, p. 163-179, 1981 Special Publication.
- LUZ, R. K. **Aspectos da larvicultura do trairão *Hoplias lacerdae*: Manejo alimentar, densidade de estocagem e teste de exposição ao ar**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- MEEREN, T. Selective feeding and prediction of food consumption in trubot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) reared on the rotifer *Brachionus plicatilis* and natural zooplankton. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 93, p. 35-55, 1991.
- NAEGEL, L. C. A. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. **Aquacultural Engineering**, Londres, v. 21, p. 49-59, 1999.
- OLSEN, A. I.; ATTRAMADAL, Y.; REITAN, K. I.; OLSEN, Y. Food selection and digestion characteristics of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed cultivated prey organisms. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 181, p. 293-310, 2000.
- OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: Fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Editora Agropecuária, 1998. 211p.
- PERSON LE RUYET, J. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. **Advances Tropical Aquaculture**, v. 9, p. 625-642, 1989.

PERSON LE RUYET, J.; ALEXANDRE, J. C.; THÉBAUD, I.; MUGNIER, C. Marine fish larvae feeding: Formulated diets or liver prey? **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 24, n. 2, p. 211-224, 1993.

PORTELLA, M. C.; CARNEIRO, D. J.; RAZZANTE, C. Desenvolvimento e sobrevivência de larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*), após substituição do alimento vivo pelo artificial. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13; ENCONTRO BRASILEIRO DE GRUPOS DE PESQUISAS DE PEIXES EM ESTUÁRIO, 1. 1999, São Paulo. **Anais...**São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. 1999. p. 533.

RUST, M. B.; HARDY, R. W.; STICKNEY, R. R. A new method for force-feeding larval fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 116, p.341-352, 1993.

SAELE, O.; SOLBAKKEN, J. S.; WATANABE, K.; HAMRE, K.; PITTMAN, K. The effect of diet on ossification and eye migration in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 220, p.683-696, 2003.

SCHIPP, G. R.; BOSMANS, J. M. P.; MARSHALL, A. J. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 174, p. 81-88, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Análise da seletividade alimentar em larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (Híbrido, Pacu – *Piaractus mesopotamicus* – e Tambaqui – *Colossoma macropomum* – sobre os organismos zooplancctônicos. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Botucatu, v. 6, p. 114-132, 1993.

STØTTRUP, J. G.; NORSKER, N. H. Production and use of copepods in marine fish larviculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, p. 231-247, 1997.

TAKATA, R. **Desempenho e sobrevivência de larvas de oscar *Astronotus ocellatus* em diferentes condições alimentares**. 2004. Monografia. (Graduação). Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas – Centro Universitário federal, Alfenas, 2004.

TANDLER A.; KOLKOVSKI, S. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful use of microdiets in *Sparus aurata* larval rearing. In: Lavens P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. (Ed.). FISH & CRUSTACEANS LARVICULTURE SYMPOSIUM. Gent, Belgium: European Aquaculture Society, 1991. p. 169-171.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão; tradução de Vera Lúcia Mixtro Chama**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 220p.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Editora Prentice – Hall. 1998. 930 p.

Substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca na lactação de vacas Friesas de alta produtividade

Resumo - Lactação de vacas Friesas de alta produtividade de produção média de 27,5 kg de leite/dia e 10,5% de gordura. O objetivo do trabalho foi avaliar a substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca durante a lactação. O experimento foi conduzido com 40 vacas de alta produtividade, divididas em dois grupos: grupo A (alimento vivo) e grupo B (dieta seca). O grupo A recebeu 12 kg de milho verde e 12 kg de feno de alfafa por vaca/dia, enquanto o grupo B recebeu 12 kg de milho verde e 12 kg de feno de alfafa por vaca/dia. O experimento foi conduzido durante 120 dias, com avaliações diárias da produção de leite e da composição química do leite. Os resultados mostraram que a substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca durante a lactação não afetou a produção de leite e a composição química do leite. Portanto, a substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca durante a lactação é uma alternativa viável para a produção de leite em vacas de alta produtividade.

CAPÍTULO II

Este capítulo apresenta os resultados obtidos durante o experimento de substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca durante a lactação de vacas Friesas de alta produtividade. Os resultados são apresentados em forma de tabelas e gráficos, com o objetivo de facilitar a interpretação dos dados. Os resultados mostram que a substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca durante a lactação não afetou a produção de leite e a composição química do leite. Portanto, a substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca durante a lactação é uma alternativa viável para a produção de leite em vacas de alta produtividade.

Palavras-chave: Produção leiteira, substituição progressiva do alimento vivo por dieta seca, vacas Friesas de alta produtividade.

Substituição precoce do alimento vivo por dieta seca na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus*

Resumo - Larvas de muitas espécies de peixes dependem de organismos vivos para o seu desenvolvimento e crescimento inicial, mas o uso de dietas secas na criação das larvas tem sido bastante desejado. Dois experimentos foram delineados com o objetivo de determinar o tempo mais precoce para a substituição do alimento vivo por dieta seca na criação de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* sem que haja prejuízos ao crescimento e sobrevivência dos animais. No primeiro foram avaliados diferentes tempos para iniciar a retirada dos náuplios de *Artemia*: após nove, 15, 21 e 27 dias do início da alimentação exógena (IAE) utilizando-se a dieta comercial microencapsulada (HatchFry Encapsulon, Argent, EUA). No segundo, dois tempos para a substituição dos náuplios, 12 e 21 dias após o IAE, foram testados associando-se diferentes tipos de dieta secas: experimental microencapsulada - EE e microaglutinada - EA; e duas dietas comerciais: C-I (Hatchfry Encapsulon) e C-II (Fry Feed Kyowa B, Japão). Ambos os ensaios apresentaram ainda dois tratamentos controle: larvas em jejum (JJ) e alimentação com náuplios de *Artemia* (A) por todo o período. Foram utilizadas larvas com cinco dias de vida, iniciando a alimentação exógena e ambos os estudos tiveram uma duração experimental de 35 dias. No primeiro estudo, larvas alimentadas com náuplios por todo período apresentaram um maior crescimento ($P < 0,05$) e os dois tempos mais precoces para a retirada do alimento vivo (nove e 15 dias após IAE) proporcionaram as menores taxas de sobrevivência ($P < 0,05$), 26% seguido de 46%, respectivamente, contra médias de 70 a 78% obtidas nos demais. No segundo experimento, as larvas alimentadas com a EE apresentaram um menor crescimento que as do controle "A" ($P < 0,05$), independentemente do tempo para a retirada do alimento vivo; já as larvas que receberam as dietas EA e C-I apresentaram um mesmo crescimento final ($P > 0,05$) que as do grupo "A" quando a substituição do alimento vivo foi mais tardia. Os melhores resultados foram observados com as larvas que receberam a dieta C-II, tanto com a retirada do alimento vivo aos 12 ou 21 dias do IAE. No momento da substituição aos 12 dias, larvas desses tratamentos possuíam o trato digestivo com características semelhantes, assim como as larvas na substituição aos 21 dias. As taxas de sobrevivência foram menores ($P < 0,05$) na substituição mais precoce, cerca de 57 a 65%, exceto com a dieta C-II (76%), que foi semelhante às obtidas nos grupos de larvas que tiveram o alimento vivo substituído mais tardiamente e no controle "A". Encorajados pelas respostas obtidas com a dieta C-II, o fornecimento exclusivo da dieta seca para larvas de também foi avaliado, obtendo-se cerca de 11% de sobrevivência. No presente estudo, a possibilidade de substituir o alimento vivo mais precocemente, com larvas apresentando cerca de 13mg de peso úmido (12 dias do IAE), pôde ser constatada sem que fossem prejudicados o crescimento e a sobrevivência dos animais em relação aos que receberam alimento vivo por todo período. O sucesso para essa prática na criação de larvas de pacu foi influenciado, sobretudo, pela eficiência das dietas secas utilizadas.

Palavras-chaves: *Piaractus mesopotamicus*, larva de peixes, náuplios de *Artemia*, dieta seca, substituição do alimento vivo.

Early weaning from live food to dry diet in pacu *Piaractus mesopotamicus* larviculture

Abstract - The larvae of many fish species depend on live organisms for their development and initial growth; however, the use of dry diets in larval rearing has been often desired. Two experiments were designed in order to determine the earliest time at which pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae can be weaned from live food to dry diet, without harmful effects on the growth and survival of the animals. In the first experiment, different weaning times from *Artemia* nauplii to dry diet were evaluated, beginning at: nine, 15, 21, and 27 days after the beginning of exogenous feeding using a commercial microencapsulated diet (HatchFry Encapsulon, Argent, USA). In the second, two weaning times were tested, 12 and 21 days after the beginning of exogenous feeding, using different types of dry diets: an experimental microencapsulated - EE and an experimental microagglutinated - EA diet, in addition to two commercial diets: DC-I (Hatchfry Encapsulon) and DC-II (Fry Feed Kyowa B, Japan). Both studies also had two control treatments: starved larvae (SV) and larvae fed *Artemia* nauplii (A) for the entire period; 5-day old larvae beginning exogenous feeding were used; the experimental period lasted 35 days. In the first study, larvae fed nauplii during the entire period showed greater growth ($P < 0.05$), while the two earliest live food suppression times (nine and 15 days after the beginning of exogenous feeding) provided the smallest survival rates ($P < 0.05$), with values of 26% followed by 46%, respectively, against means ranging from 70 to 78% obtained at the other weaning times. In the second experiment, larvae fed EE showed smaller growth than those in control "A" ($P < 0.05$), regardless of weaning time; in turn, larvae that received diets EA and C-I showed the same final growth ($P > 0.05$) as those in control "A" when live-food weaning occurred later (21 days from the beginning of exogenous feeding). The best results were observed with larvae that received DC-II, both at early and late weaning (12 or 21 days from beginning of exogenous feeding). When the larvae were weaned at 12 days, their digestive tracts showed similar characteristics, as well as larvae weaned at 21 days. Survival rates (ranging from about 57 to 65%) were smaller ($P < 0.05$) at the earliest weaning time, except for diet DC-II (76%), which was similar to those obtained with the groups of larvae submitted to late weaning and those in control "A". The promising responses obtained with diet C-II encouraged us to evaluate larval feeding on dry diet alone as well, and a survival rate of about 11% was obtained. In the present study, the feasibility of successfully weaning onto a dry diet was verified for pacu larvae, and it was influenced by weaning time, but also mainly by the efficiency of the dry diets used.

Key words: *Piaractus mesopotamicus*, fish larvae, *Artemia* nauplii, dry diet, weaning

1. Introdução

A disponibilidade de organismos vivos, em quantidade e qualidade adequadas, nas primeiras alimentações das larvas da maioria das espécies de peixes é uma prática essencial, já fundamentada e há muitos anos preconizada. Essa dependência do alimento vivo para a larvicultura acaba limitando a produção comercial dos juvenis. Na expectativa de superar algumas dificuldades durante a criação das larvas, dietas secas que substituam totalmente o alimento vivo ou minimizem o período de sua utilização são altamente desejáveis, pois favoreceria a produção em larga escala, diminuindo os gastos com a produção do alimento vivo (BELTRAN e CHAMPIGNEULLE, 1992; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001) e simplificando as operações da criação (WATANABE e KIRON, 1994).

Nesse sentido, nos últimos anos, esforços têm sido direcionados na tentativa de desenvolver microdietas para larvas (PLANAS e CUNHA, 1999). Para algumas espécies de peixes, o uso de dietas secas logo no início do desenvolvimento larval tem sido praticado com relativo sucesso (APPELBAUM e VAN DAMME, 1988; FERNANDEZ-DÍAZ et al., 1994). No entanto, para a maioria das espécies, esse procedimento ainda apresenta uma série de dificuldades (PERSON LE RUYET, 1989) e a supressão total ou precoce do alimento vivo na criação das larvas representa ainda um importante desafio para muitas das espécies de peixes (CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001).

O pacu *Piaractus mesopotamicus*, espécie originária da Bacia do Prata, mais especificamente dos rios Paraná e Paraguai e seus afluentes, possui ampla distribuição ocorrendo no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai, e destaca-se pela rusticidade ao manejo, qualidade de sua carne e boa aceitação pelo mercado consumidor. Estudos com larvas de pacu visando a substituição do alimento vivo por dieta seca têm revelado resultados de crescimento e sobrevivência insatisfatórios quando o alimento vivo é suprimido, tanto pela transição alimentar abrupta como a gradual, (JOMORI, 1999; MACEDO-VIEGAS et al., 2003; TESSER et al., 2005) e até mesmo apresentado ocorrência

de mortalidade total das larvas (em tempo similar à mortalidade das mantidas em jejum) quando o alimento seco é fornecido exclusivamente desde o início (TESSER et al., 2005).

Informações sobre o uso da dieta seca na larvicultura do pacu não estão bem definidas, sendo necessários estudos complementares para possibilitar a substituição do alimento vivo nessa fase. Dessa forma, o estudo propôs avaliar vários tempos para iniciar a substituição do alimento vivo, definir os melhores momentos para isso e investigar a influência de diferentes dietas secas na substituição do alimento vivo de forma bem sucedida.

2. Material e Métodos

Dois estudos sobre a transição do alimento vivo para o seco foram delineados, avaliando-se os possíveis efeitos desse procedimento no crescimento e sobrevivência das larvas e no desenvolvimento do trato digestório. No primeiro, foram verificados diferentes tempos para a retirada total do alimento vivo utilizando uma dieta comercial microencapsulada e, no segundo, baseado nas informações do primeiro, dois tempos para iniciar a substituição do alimento vivo foi testado associados às diferentes dietas secas, experimentais e comerciais.

Condições experimentais gerais

Os experimentos foram realizados sob condições laboratoriais semelhantes. Larvas de pacu obtidas por reprodução induzida, com cinco dias após a eclosão e iniciando a alimentação exógena, foram estocadas numa densidade de 10 larvas.L⁻¹, em tanques de polietileno com 100 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo, e com aeração artificial constante. Os parâmetros limnológicos (média e desvio padrão) observados nos dois experimentos foram $6,80 \pm 1,50$ mg.L⁻¹; 175 ± 10 μ S.cm⁻¹ e $7,5 \pm 1,0$ para oxigênio dissolvido, condutividade e pH, respectivamente. As médias de temperatura apresentaram variações de 28,5 a 30,5 °C, entre manhã e tarde. Os resíduos acumulados no fundo dos tanques eram diariamente removidos por sifonamento.

Experimento I – Substituição do alimento vivo por dieta seca em diferentes tempos

Larvas apresentando médias de comprimento total de $5,3 \pm 0,1\text{mm}$ e peso úmido de $0,5 \pm 0,03\text{mg}$ foram alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* ou submetidas ao processo de substituição do alimento vivo por dieta seca (comercial microencapsulada Hatchfry Encapsulon – Argent, EUA) após nove, 15, 21 e 27 dias do início. Os tratamentos alimentares estão descritos na Figura 1.

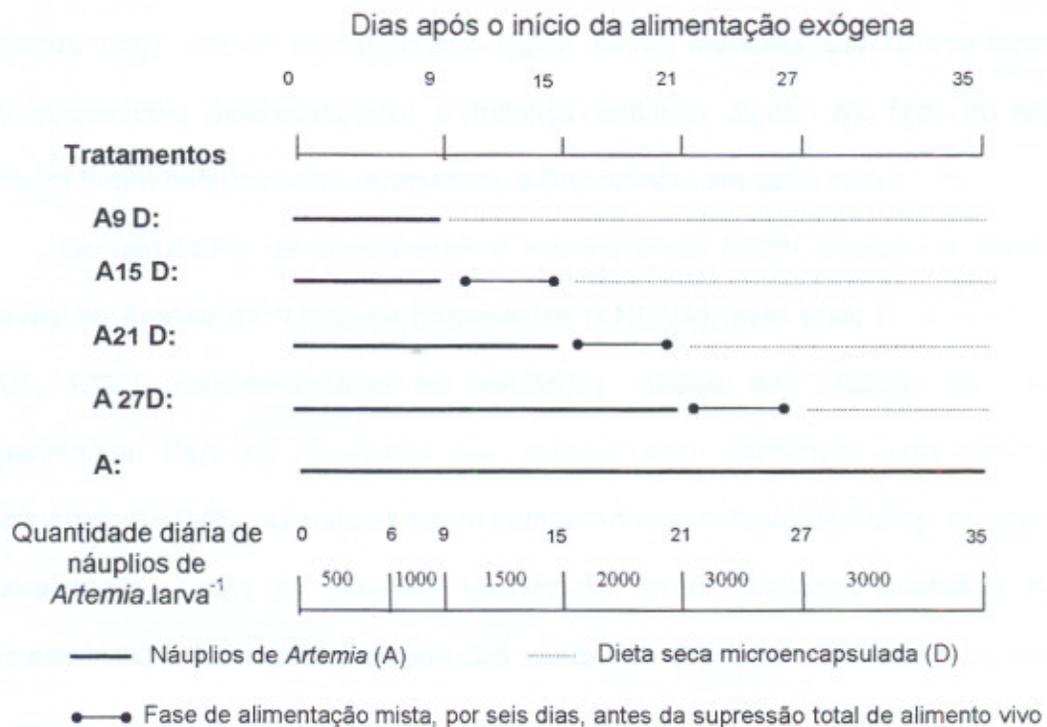


Figura 1. Esquema dos tratamentos alimentares e quantidade de náuplios de *Artemia* oferecida às larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*.

No estudo foram avaliadas a substituição abrupta, a partir de nove dias, e a sobreposição dos alimentos (alimentação mista), por um período de seis dias, antes da retirada total do alimento vivo nos demais tratamentos. Os náuplios de *Artemia* e dieta seca foram oferecidos na frequência de quatro vezes ao dia e, durante a fase de alimentação mista, o alimento vivo foi diminuído gradualmente nas proporções de 25%, 50 e 75%, a

cada dois dias, em relação à quantidade de náuplios oferecida no respectivo período. O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado, constituído de cinco tratamentos, com cinco repetições cada e teve uma duração de 35 dias.

Avaliação do crescimento e sobrevivência das larvas

Para a avaliação do crescimento, 50 larvas de cada repetição foram coletadas, aos 6, 9, 15, 21, 27 e 35 dias após o início da alimentação (fixadas em formol a 10% e preservadas em álcool a 70%). Determinou-se o comprimento total (mm) e o peso úmido individual (mg), usando-se paquímetro digital (larvas menores que 10 mm foram medidas sob microscópio estereoscópico) e balança analítica digital. No final do experimento, também foram determinadas as taxas de sobrevivência em cada tratamento.

Os resultados de crescimento e sobrevivência foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância Paramétrica (ANOVA), pelo teste F de Fischer-Snedecor (ZAR, 1998), considerando-se os resultados médios das réplicas de cada parcela experimental. Para os resultados que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todas as variáveis biométricas foram avaliadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Bartlett). Os dados de sobrevivência foram transformados em $y = \arcsin \sqrt{x/100}$, sendo x o valor da porcentagem de sobrevivência. Todas as análises e transformações foram analisadas através de programa SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, v.8).

Experimento II – Diferentes dietas secas como substitutos, precoce e tardio, do alimento vivo

Larvas com médias de comprimento total de $5,7 \pm 0,1$ mm e peso de $0,56 \pm 0,04$ mg foram submetidas à transição alimentar após 12 e 21 dias do início da alimentação exógena. Quatro dietas secas foram testadas, sendo duas dietas experimentais: experimental microencapsulada (EE) e dieta experimental microaglutinada (EA); e mais

duas comerciais: (C-I) comercial microencapsulada HatchFry Encapsulon, Argent - EUA; e (C-II) comercial FryFeed Kyowa B, Kyowa Hakko Kogyo, Japão. Além das dietas secas, dois grupos foram utilizados como controle, larvas alimentadas somente com náuplios de *Artemia* por todo período (A) e larvas mantidas em jejum (JJ). Os tratamentos alimentares delineados são apresentados na Figura 2.



Figura 2. Representação esquemática dos diferentes momentos para a substituição do alimento vivo e dos protocolos alimentares adotados no experimento. A12 e A21 significam alimento vivo por 12 e 21 dias, respectivamente, seguido exclusivamente pelas dietas secas, experimentais ou comerciais.

No período de alimentação mista, as quantidades de náuplios de *Artemia* foram decrescentes na proporção de 25 e 50%, a cada três dias, em relação às quantidades do respectivo período. As dietas comerciais I (HatchFry Encapsulon) e II (FryFeed Kyowa B), apresentaram, respectivamente, composição química (analisada) em cerca de 52 e 51% de proteína bruta; 12 e 9% de matéria mineral; 11 e 15% de extrato etéreo e 4700 e 5200 calorias de energia bruta/grama. As informações das dietas experimentais estão na Tabela 1. O tamanho de partícula das dietas secas variou de 250 a 450 μm e o fornecimento foi à

vontade, seis vezes ao dia. A produção experimental de dieta microencapsulada para larvas de peixes é uma atividade inédita e pioneira no Brasil, e foi realizada em parceria com o Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Tabela 1. Formulação e composição química analisada das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais	
	Microencapsulada (EE)	Microaglutinada (EA)
Silagem de Pacu (inteiro)	15,00	11,20
Hidrolisado de peixe	5,00	5,00
Filé de pacu	28,00	-
Farinha de sangue	-	20,00
Soja texturizada	-	16,90
Levedura desidratada	9,00	10,00
Ovo integral desidratado	16,40	-
Clara integral	11,60	-
Amido de arroz	12,50	5,40
Gémen de trigo	-	3,00
Camarão inteiro	-	12,00
Óleo de fígado de bacalhau	-	5,00
Mistura mineral e Vitamínica	2,50	1,50
<i>Composição analisada (%)</i>		
Matéria Seca	93,22	89,33
Proteína Bruta	44,71	43,62
Matéria Mineral	4,83	6,07
Extrato Etéreo	18,59	13,78
Energia Bruta (Cal/g)	5.323,23	4.346,44

Análises bromatológicas foram realizadas conforme metodologia descrita pela A.O.A.C. (1984).

O experimento II foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído por dez tratamentos, com três repetições, e teve uma duração de 35 dias. As coletas, realizadas aos 6, 12, 15, 21, 27 e 35 dias após o início, e as avaliações para o crescimento e sobrevivência foram realizadas de maneira semelhante ao experimento anterior. Para complementar as informações de crescimento, uma análise mais minuciosa

foi realizada na última amostragem, através da separação dos animais em classes de tamanho.

Tendo em vista os resultados obtidos com a dieta comercial FryFeed Kyowa B, um outro ensaio foi realizado para averiguar a possibilidade do fornecimento exclusivo de dieta seca na alimentação das larvas de pacu. Assim, animais iniciando a alimentação exógena foram alimentados exclusivamente com essa dieta seca ou alimento vivo e, um outro grupo, mantido em jejum. O experimento foi realizado nas mesmas condições experimentais que os anteriores, com cinco repetições e tendo uma duração de 35 dias.

Análise da solubilidade das dietas secas na água

As dietas secas foram avaliadas qualitativamente quanto à solubilidade da partícula após diferentes períodos de permanência na água. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, São Paulo, segundo a metodologia adaptada de Lee e Rosenberg (2000).

Avaliação histológica do trato digestório das larvas

Amostras de larvas foram coletadas ao longo do experimento, simultaneamente às coletas para as avaliações do crescimento. Os animais foram fixados em formol 10% tamponado, por 24 horas e, em seguida, preservados em álcool 70%.

Para a caracterização da morfologia do aparelho digestório de larvas de pacu ($n=3$), estas foram incluídas em Historesin® (Leica-Germany). As larvas fixadas foram submetidas ao processo de pré-infiltração com solução de glicol-metacrilato e ativador (embedding kit – Leica) e etanol a 80 % em diferentes concentrações (1:3, 1:1, 3:1 v/v), durante 3 horas. Em seguida, o material foi embebido em glicol-metacrilato (mescla de infiltração) durante 1 hora.

Posteriormente, o material foi incluído em solução de pré-inclusão (glicol-metacrilato + ativador) com endurecedor, em molde histológico. Após endurecimento parcial da solução, os blocos foram colocados em estufa à temperatura de 45 °C por

aproximadamente 72 horas, para a polimerização e endurecimento total. Cortes histológicos de três micrômetros de espessura foram obtidos com a utilização de navalhas de vidro e posteriormente corados com Azul de Toluidina a 1% (AT) e Fucsina básica a 0,5 % (FUC).

3. Resultados

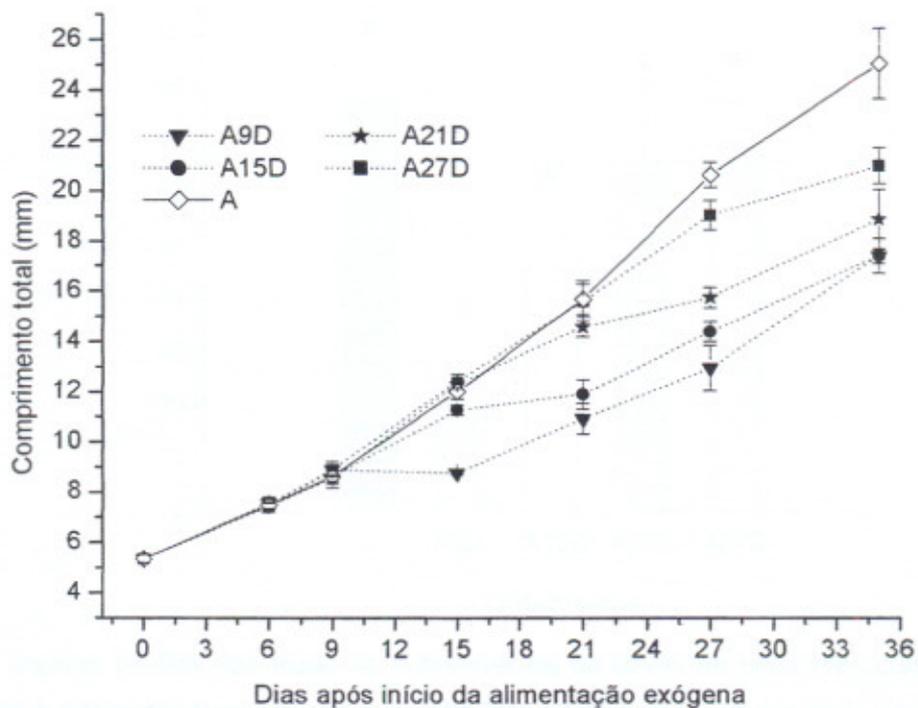
Experimento I – Substituição do alimento vivo por dieta seca em diferentes tempos

Os resultados das análises estatísticas referentes aos valores médios de comprimento total e peso mostraram efeitos altamente significativos ($P < 0,01$) para os tempos de substituição do alimento vivo. Os efeitos dos tratamentos ficaram claramente evidenciados observando-se o crescimento dos animais ao longo do tempo (Figura 3).

Até seis e nove dias, períodos em que as larvas recebiam as mesmas quantidades de alimento vivo, as médias entre todos os tratamentos foram praticamente semelhantes, $7,47 \pm 0,05\text{mm}$ e $8,72 \pm 0,6\text{mm}$ para comprimento total e $1,73 \pm 0,08\text{mg}$ e $3,72 \pm 0,14\text{mg}$ para peso, respectivamente. Já na análise realizada aos 15 dias, primeiro período após a substituição total ou a diminuição do alimento vivo, as larvas que passaram por esses processos, A9D e A15D, respectivamente, já diferiram das demais ($P < 0,05$), que continuaram recebendo náuplios de *Artemia*. Esse mesmo efeito também foi observado posteriormente, aos 21 e 27 dias, nos tratamentos que sofreram a transição alimentar mais tardiamente, A21D, e A27D, respectivamente, nos quais as taxas de crescimento das larvas diminuíram com o fornecimento de menores quantidades de náuplios na alimentação mista e, na seqüência, com a retirada total desse alimento.

A substituição do alimento vivo em diferentes tempos influenciou ($P < 0,05$) também na sobrevivência dos animais (Figura 4). A menor média foi verificada no procedimento mais precoce (A9D), $26 \pm 4\%$, seguido pelo tratamento que recebeu a alimentação mista em quantidades decrescentes de náuplios a partir de nove dias (A15D), de $46 \pm 9\%$. Nos demais tratamentos, A, A21D e A27D, as médias de sobrevivência não diferiram ($P > 0,05$) da taxa obtida com o fornecimento do alimento vivo foi por todo período (~ 69 a 78%).

3A



3B

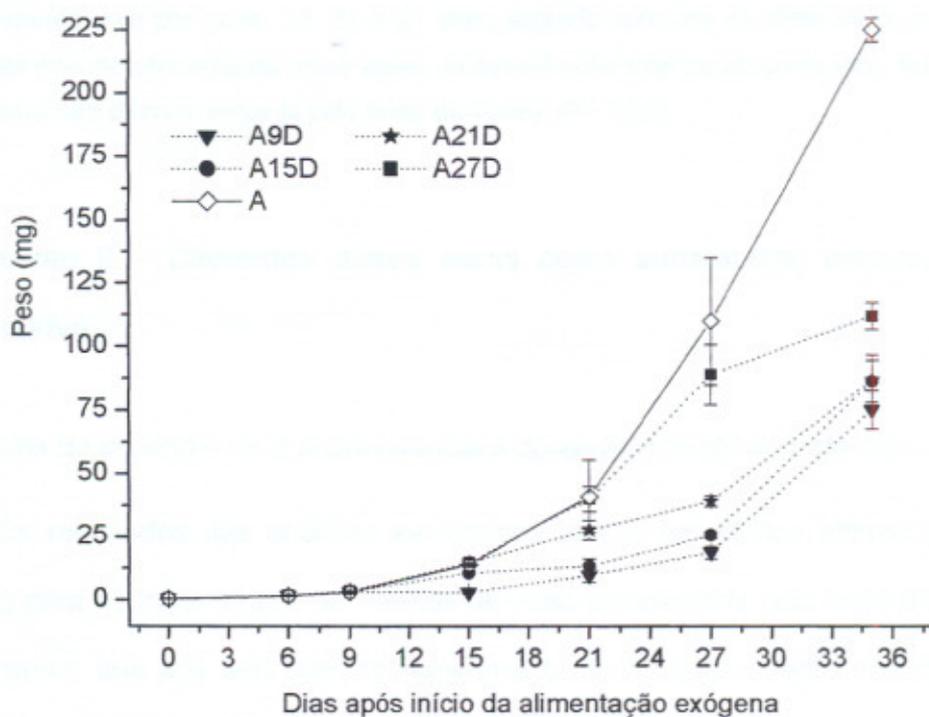


Figura 3. Valores médios de comprimento total (3A) e peso (3B) das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidas a diferentes tempos para a substituição do alimento vivo por dieta seca. A: alimento vivo por todo o período; A9D, A15D, A21D e A27D: alimento vivo por nove, 15, 21 e 27 dias, seguido somente de dieta seca; nos A15D, A21D e A27D: seis dias de alimentação mista antes da substituição total do alimento vivo.

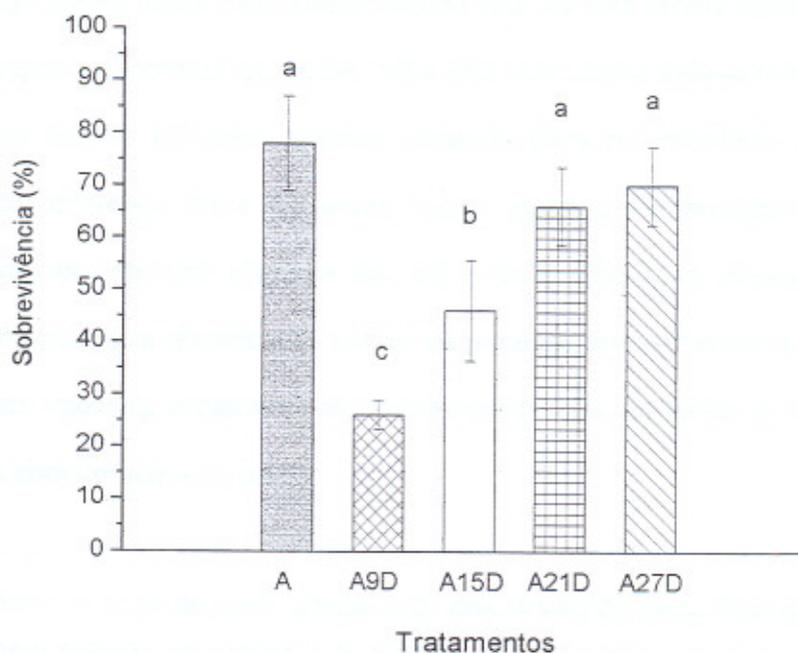


Figura 4. Valores médios das taxas de sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidas a diferentes tempos para a substituição do alimento vivo por dieta seca, ao final de 35 dias após início da alimentação exógena. A: alimento vivo por todo período; A9D, A15D, A21D e A27D: alimento vivo por nove, 15, 21 e 27 dias, seguido somente de dieta seca; nos A15D, A21D e A27D: seis dias de alimentação mista antes da substituição total do alimento vivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Experimento II – Diferentes dietas secas como substitutos, precoce e tardio, do alimento vivo

Resultados de crescimento e sobrevivência e desenvolvimento do trato digestório

Os resultados das análises estatísticas mostraram efeitos altamente significativos ($P < 0,01$) para os tratamentos. As médias de peso comparadas pelo teste de Tukey (Tabela 2) mostraram que aos seis dias de experimento o único tratamento que diferenciou foi o mantido em jejum ($P < 0,05$), pois nos demais tratamentos, as larvas estavam recebendo as mesmas quantidades de alimento vivo, embora nos tratamentos A12, as respectivas dietas secas já faziam parte da alimentação diária das larvas.

Nessa fase, seis dias após o início da alimentação exógena, as larvas que receberam náuplios de *Artemia* (~1,5 a 2mg) apresentavam a região correspondente ao

futuro estômago ligeiramente mais desenvolvida que as das larvas iniciais (~0,5mg) e das mantidas em jejum (~0,3mg) (Figuras 5A, 5B e 5C). A mucosa estava revestida em algumas regiões por um epitélio cilíndrico simples variando para pavimentoso simples em outras partes. A maior diferença entre as larvas inicial, jejum e alimentada foi evidenciada no desenvolvimento do intestino (Figuras 6A, 6B e 6C). Enquanto larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* já apresentavam várias vilosidades preenchendo quase toda a luz da região média do intestino, e células caliciformes presentes, as larvas em jejum possuíam a mesma região com um aspecto plano.

Tabela 2 - Valores médios de peso úmido (mg) das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidas a dois tempos de substituição do alimento vivo com diferentes dietas secas.

Tratamentos	Dias após o início da alimentação exógena					
	6	12	15	21	27	35
A	1,85±0,1 ^a	15,8±0,4 ^a	32,2±4,9 ^a	69,1±2,1 ^a	152,6±11,0 ^a	287,7±95,1 ^b
Jejum	0,27±0,05 ^b	0,25±0,07 ^b	-	-	-	-
A12 - EE	1,5±0,1 ^a	12,8±2,5 ^a	12,3±1,9 ^b	12,0±1,6 ^d	17,7±1,9 ^e	27,3±3,2 ^c
A12 - EA	1,7±0,2 ^a	12,9±0,7 ^a	13,2±0,2 ^b	24,9±5,2 ^c	32,2±2,2 ^{de}	76,0±7,0 ^c
A12 - C I	1,5±0,1 ^a	12,3±0,8 ^a	12,6±2,1 ^b	31,9±4,3 ^c	52,5±8,6 ^{cd}	206,0±68,0 ^{bc}
A12 - C II	1,7±0,3 ^a	12,6±0,8 ^a	15,9±0,8 ^b	44,6±2,6 ^b	94,3±13,9 ^b	601±123,0 ^a
A21 - EE	2,1±0,5 ^a	13,9±0,8 ^a	25,6±0,6 ^a	47,1±2,2 ^b	42,8±2,9 ^c	79,1±14,3 ^c
A21 - EA	2,1±0,3 ^a	14,20±0,7 ^a	27,5±1,2 ^a	48,3±4,3 ^b	85,0±13,0 ^b	306,2±59,3 ^b
A21 - C I	2,1±0,2 ^a	14,5±1,6 ^a	26,5±1,6 ^a	45,3±9,2 ^b	77,3±15,8 ^{bc}	285,6±52,3 ^b
A21 - C II	2,2±0,1 ^a	15,2±2,1 ^a	26,9±5,1 ^a	60,1±6,0 ^a	142,0±16,6 ^a	650,4±32,1 ^a

Médias seguidas de mesma letra (na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A: somente alimento vivo; A12 e A21 significam alimento vivo por 12 e 21 dias, respectivamente, seguido exclusivamente pelas dietas secas, experimentais ou comerciais. EE: dieta experimental microencapsulada; EA: dieta experimental microaglutinada; C-I: dieta comercial HatchFry Encapsulon; C-II: dieta comercial FryFeed Kyowa B.

Após 12 dias de alimentação, as larvas dos tratamentos A12, que já vinham recebendo uma quantidade menor de alimento vivo há seis dias, praticamente não diferiram

($P > 0,05$) quanto ao peso daquelas que continuaram recebendo os náuplios em quantidades crescentes, mesmo que tenham apresentado médias ligeiramente inferiores. Provavelmente a diminuição do alimento vivo não foi o suficiente para suprimir o crescimento nesses animais no respectivo período. Da mesma maneira, o fornecimento da dieta seca desde o início nos tratamentos A12, aparentemente não provocou efeito no crescimento das larvas que pudesse indicar alguma vantagem. Nas larvas mantidas em jejum, que apresentaram as menores médias ($P < 0,05$), observou-se mortalidade total no 13º dia da alimentação exógena.

As diferenças no desenvolvimento do trato digestório foram bastante evidentes entre o período de seis a 12 dias. As larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* (A ~16mg) já apresentavam o estômago formado por duas regiões, uma glandular e outra aglandular; porém, ainda não era possível a distinção da região cárdica e pilórica (Figura 7A). Por outro lado, larvas do grupo A12 (~12 a 13 mg) apresentaram-se numa fase um pouco anterior em relação ao observado nas larvas A: o estômago também possuía as regiões glandular e aglandular, mas ainda estava num formato mais sacular (Figura 7B). No citoplasma das células das glândulas gástricas finas granulações coradas fortemente pela Fucsina Básica foram observadas, constituindo, provavelmente, grânulos de zimogênio. (Figuras 7C e 7D). O intestino apresentou padrão similar entre todos os tratamentos e com desenvolvimento mais avançado em relação ao da amostragem anterior, com vilosidades mais altas, presença de células caliciformes e inclusões supranucleares no citoplasma dos enterócitos. (Figura 8A). O fígado exibiu hepatócitos com núcleo central; porém, em algumas regiões foi observado o deslocamento do núcleo para a periferia da célula indicando o acúmulo de substância de reserva. No pâncreas constatou-se grande quantidade de grânulos maduros de zimogênio, indicando alta atividade secretora dessas células exócrinas (Figuras 8B e 8C). As larvas em jejum praticamente não se desenvolveram (Figura 8D)

A partir de 15 dias, a supressão total do alimento vivo no grupo A12 mostrou o seu efeito no crescimento, larvas desse grupo apresentaram médias de peso menores ($P < 0,05$) que as dos demais tratamentos (Tabela 2). Entre as larvas do grupo A12, o melhor resultado

de crescimento foi proporcionado pela dieta comercial II, ainda que estatisticamente com médias semelhantes. A tendência de separação das médias em dois grupos (A12 e A21) logo passa a não depender apenas do tempo de recebimento do alimento vivo, como o verificado a partir de 21 dias, quando o que prevaleceu na diferenciação do crescimento entre os tratamentos foram os tipos de dietas secas oferecidas às larvas, e esse efeito ficou cada vez mais evidente ao longo da alimentação. Assim, aos 21 dias, após o período em que os tratamentos A21 já não recebiam mais quantidades crescentes de alimento vivo, a dieta comercial II proporcionou às larvas médias semelhantes ($P>0,05$) as obtidas com o fornecimento crescente de alimento vivo (A). As larvas que receberam as dietas experimentais e a comercial I apresentaram um menor crescimento nesse período e tiveram as médias igualadas ($P>0,05$) às das larvas A12 - dieta comercial II.

As respostas de crescimento mantiveram-se bastante variáveis entre os tratamentos e influenciadas pela dieta seca utilizada. As larvas alimentadas com a dieta comercial II (FryFeed Kyowa B), independente do tempo em que ocorrera a substituição do alimento vivo, após 12 ou 21 dias, atingiram um mesmo crescimento ($P>0,05$) ao final de 35 dias. Esses tratamentos apresentaram também médias superiores aos demais ($P<0,05$), i.e. valores de 601 a 650mg de peso úmido para A12 e A21, respectivamente, contra médias de 27mg para A12-dieta experimental microencapsulada e 280mg com náuplios por todo o período. De outra maneira, as medidas de comprimento total dos animais separados por categorias de tamanho (Figura 9 e Anexo 1) ilustram bem essa variação no crescimento final em função das diferentes dietas secas que foram administradas.

Na ontogenia do trato digestório, as larvas A12 também mostraram a formação do estômago numa fase mais atrasada. Aos 15 dias, larvas A e A21, que continuaram recebendo alimento vivo, já apresentavam a mudança morfológica do estômago com a formação das regiões cárdica e pilórica (Figuras 10 A e 10B). A região cárdica do estômago apresentou na mucosa um epitélio cilíndrico simples, com os núcleos celulares em diferentes posições e abaixo desse epitélio ocorreu glândulas tubulo-alveolares, caracterizando a região glandular do estômago. A região pilórica apresentou a mucosa

constituída por um epitélio cilíndrico simples baixo, sem glândulas gástricas, caracterizando a região aglandular do estômago. As camadas submucosa e muscular apresentaram-se bem desenvolvidas. Nas larvas do grupo A12 essas diferenciações no trato digestório só foram visualizadas na amostragem referente aos 21 dias, e apenas nas larvas do tratamento que recebeu a dieta comercial II (Figura 11A). As larvas do grupo A12 dos demais tratamentos ainda apresentavam o estômago com um formato mais sacular (Figura 11B). O intestino mostrou desenvolvimento semelhante entre os tratamentos (Figura 12A). Nessa última amostragem, observou-se a presença do pâncreas intra-hepático nas larvas dos grupos A e A21 (Figura 12 B), e o melhor padrão de organização do fígado, com núcleo central e citoplasma róseo, foi verificado nos animais do tratamento A21-dieta EE.

Os resultados de sobrevivência também foram influenciados pelas diferentes alimentações (Figura 13). Taxas de sobrevivência com médias de 76% foram verificadas com a substituição precoce do alimento vivo (A12-dieta comercial II), valores que foram semelhantes ao obtido com o controle alimento vivo por todo o período. Por outro lado, taxas menores ($P < 0,05$), cerca de $57 \pm 2\%$ (A12-dietas EA e comercial I), também foram observadas entre os tratamentos do grupo A12. Diferente dos resultados de desempenho, as menores médias de sobrevivência não foram obtidas nos tratamentos com a dieta experimental microencapsulada (EE). Entre todos os valores, médias de $66 \pm 4\%$ e de $78 \pm 3\%$ foram averiguadas nos tratamento A12 e A21 com a dieta EE, respectivamente.



Figura 5 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*.

Figura 5A – Trato digestório de larva de pacu no início da alimentação exógena (primeiro dia do experimento) evidenciando o esôfago (E) com células mucosas (CM), fígado (F) e região presuntiva do estômago (TD). Larva com cinco dias de vida. 200x. At/Fuc.

Figura 5B – Trato digestório de larva de pacu mantida em jejum (tratamento **jejum**) evidenciando o esôfago (E) com células mucosas (CM), fígado (F) e região presuntiva do estômago (TD), após seis dias do início do experimento. Larva com 10 dias de vida. 200x. At/Fuc.

Figura 5C – Trato digestório de larva de pacu alimentada com náuplios *Artemia* (tratamento **A**), evidenciando células mucosas (CM), fígado (F), e o desenvolvimento do tubo digestório (TD) (a região presuntiva do estômago), após seis dias do início a alimentação exógena. Larva com 10 dias de vida. 200x. At/Fuc.



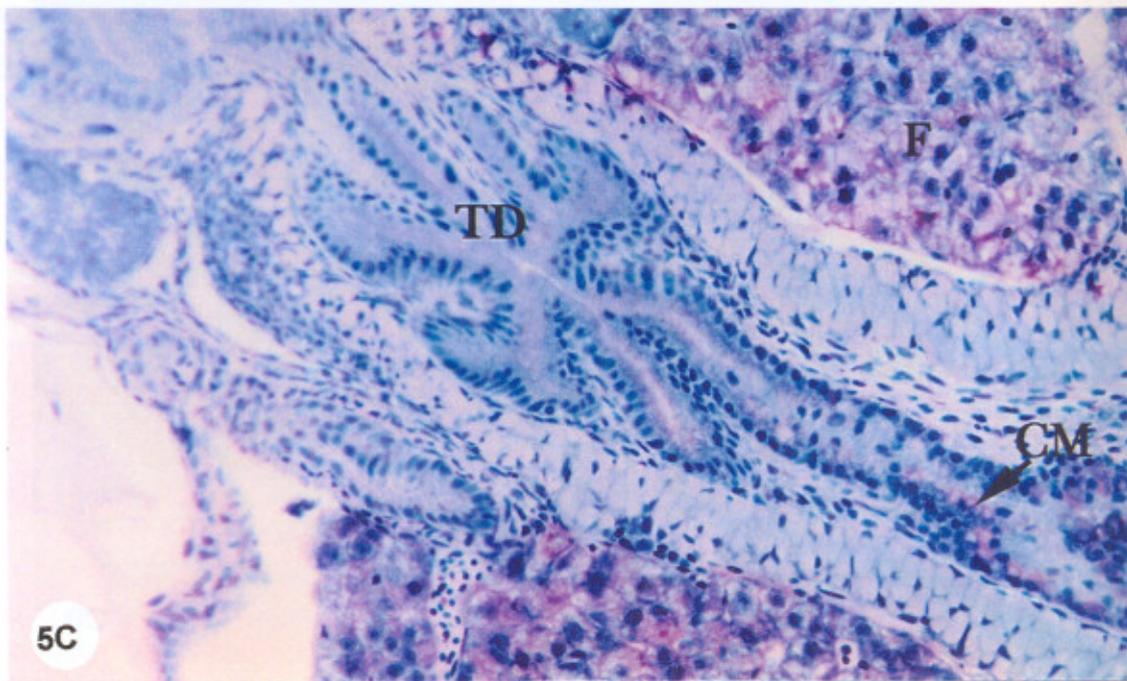
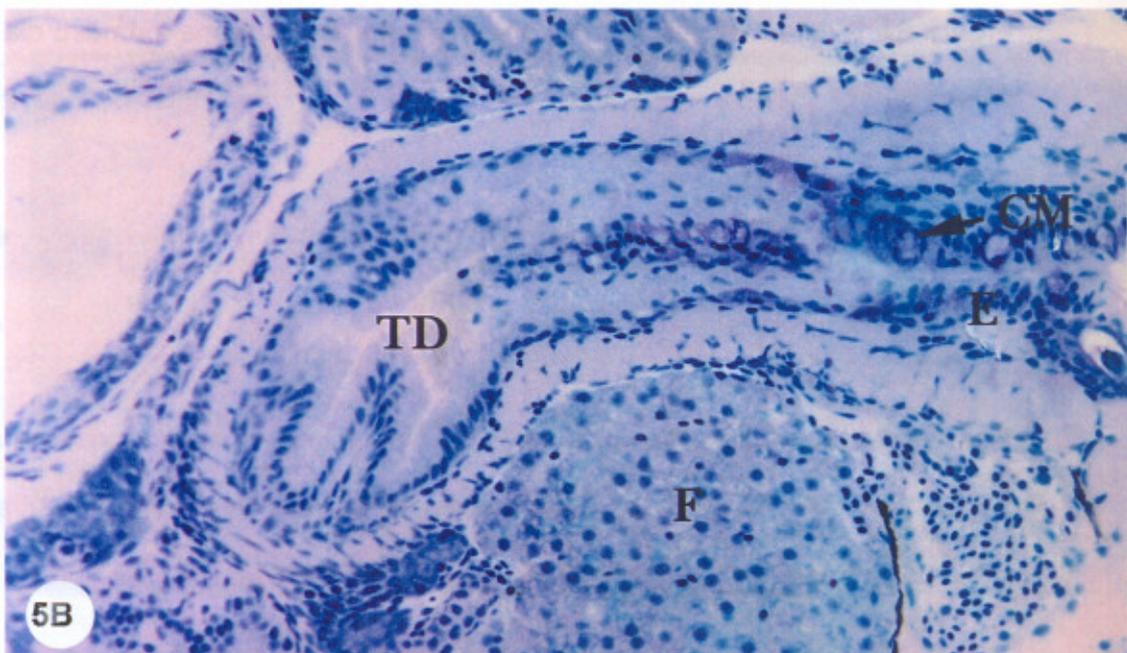
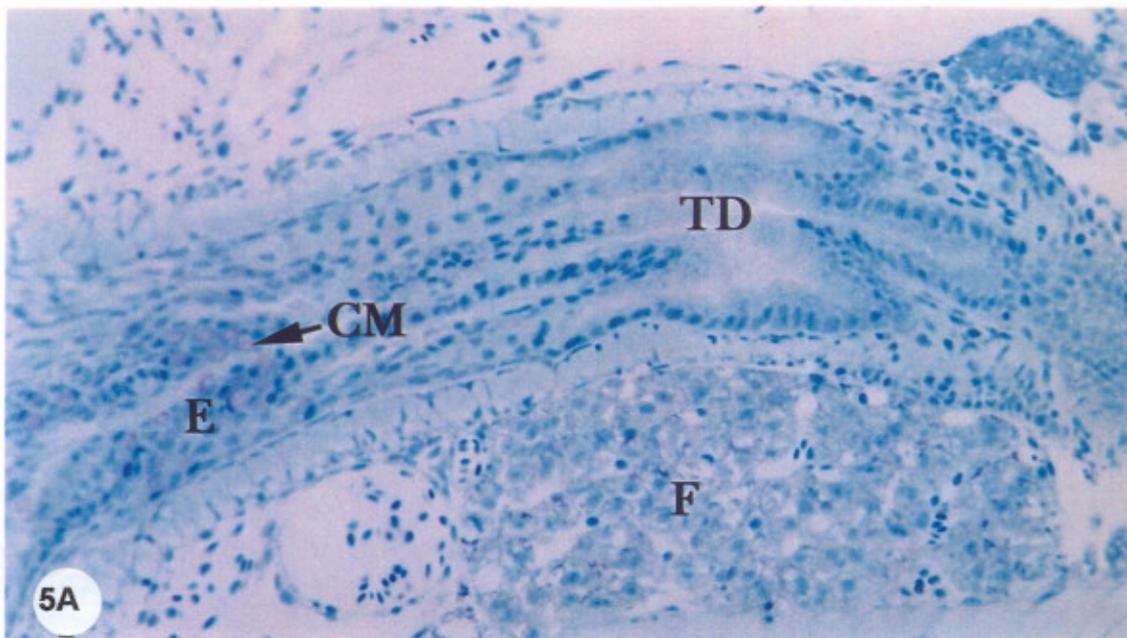


Figura 6 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*.

Figura 6A – Larva de pacu no início da alimentação exógena (primeiro dia do experimento) evidenciando o intestino (I) e pâncreas (P). Larva com cinco dias de vida. 200x. At/Fuc.

Figura 6B – Larva de pacu mantida em jejum evidenciando o intestino (I), após seis dias de experimento. Larva com 10 dias de vida. 200x. At/Fuc.

Figura 6C – Larva de pacu alimentada com náuplios *Artemia* (tratamento A), evidenciando as vilosidades no intestino (V) com presença de células caliciformes (CC), após seis dias do início da alimentação exógena. Larva com 10 dias de vida. 200x. At/Fuc.

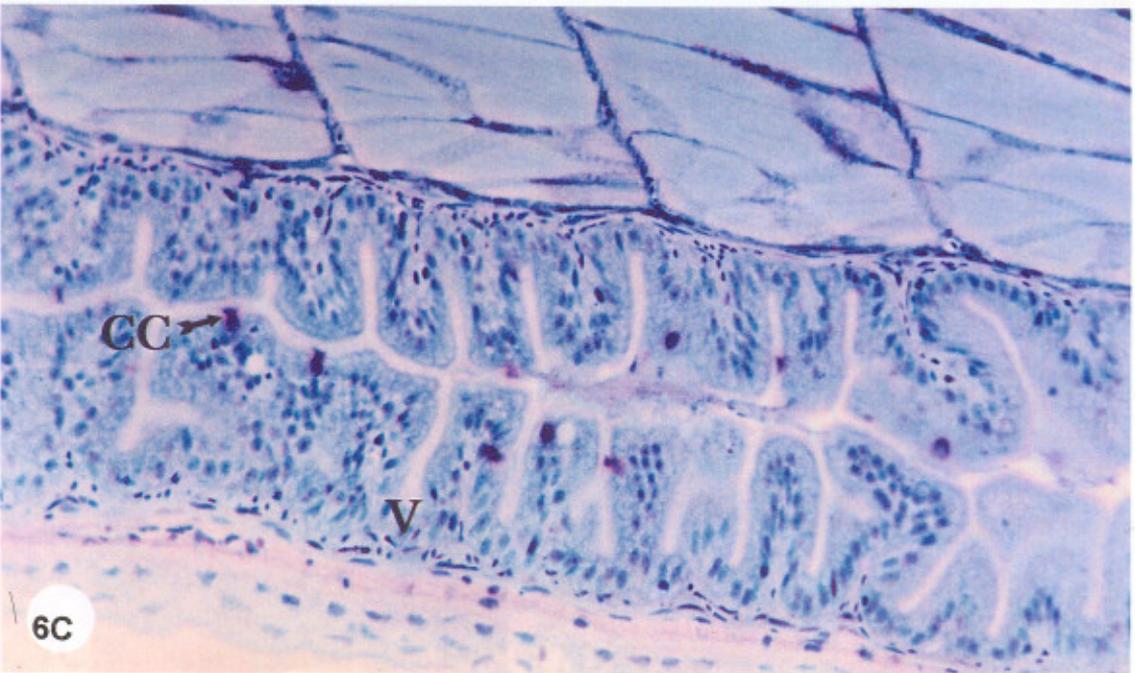
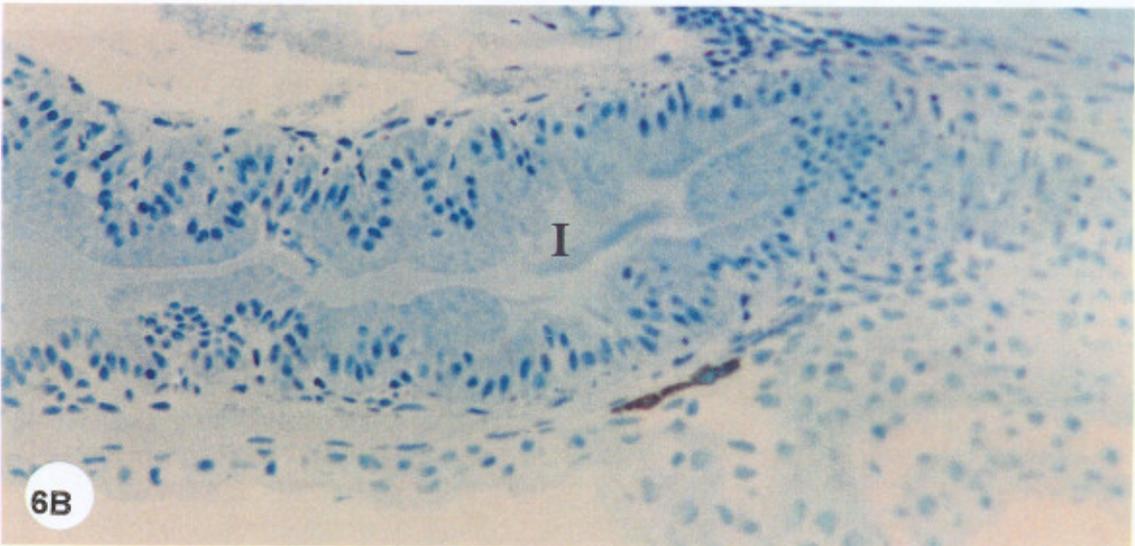
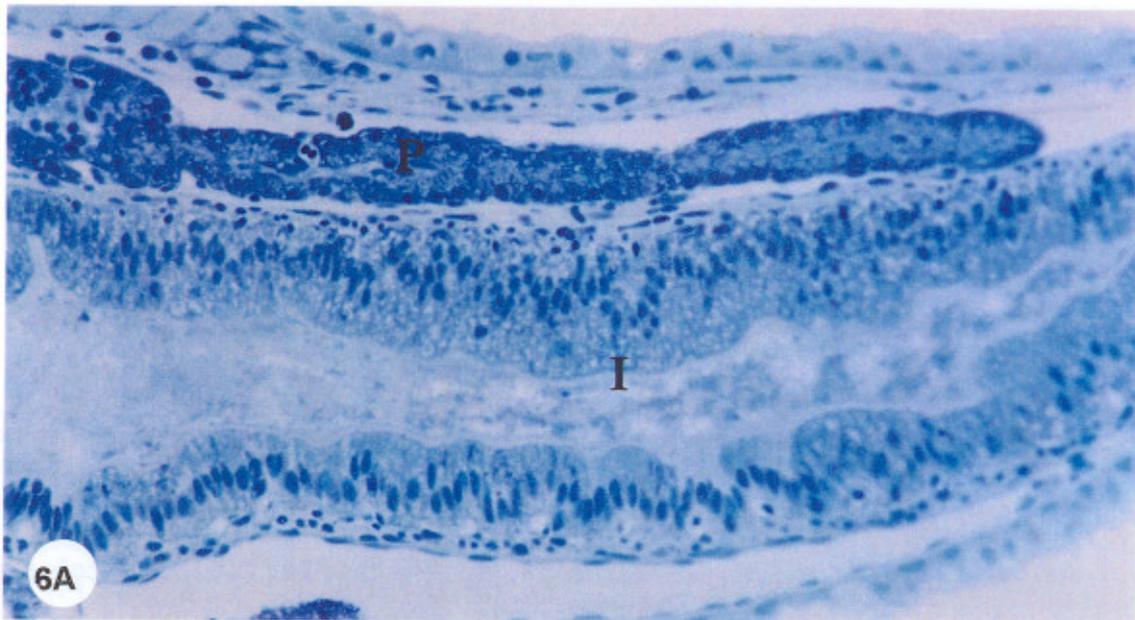


Figura 7 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* após 12 dias do início da alimentação exógena (larvas com 16 dias de vida).

Figura 7A – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades crescentes por todo o período (tratamento **A**), evidenciando o estômago com túnica muscular bem desenvolvida (TM), região glandular (G) e aglandular (AG), e secções transversais dos cecos pilóricos (CP). 100x. At/Fuc.

Figura 7B – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena (tratamento **A12-dieta C-II**), evidenciando o estômago com região glandular (G) e aglandular (AG) e pâncreas (P). 100x. At/Fuc.

Figura 7C – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena (tratamento **A12-dieta C-I**), detalhando as glândulas gástricas (GG). 200x. At/Fuc.

Figura 7D – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena (tratamento **A12-dieta C-I**), evidenciando granulações acidófilas (seta) no citoplasma das células das glândulas gástricas. 1000x. At/Fuc.

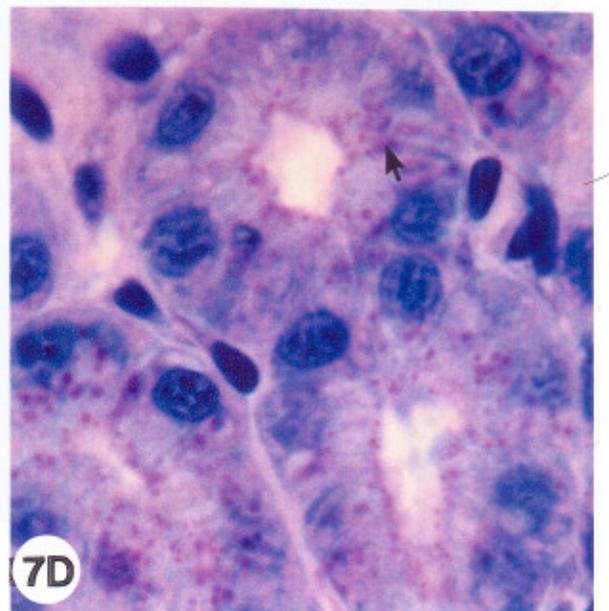
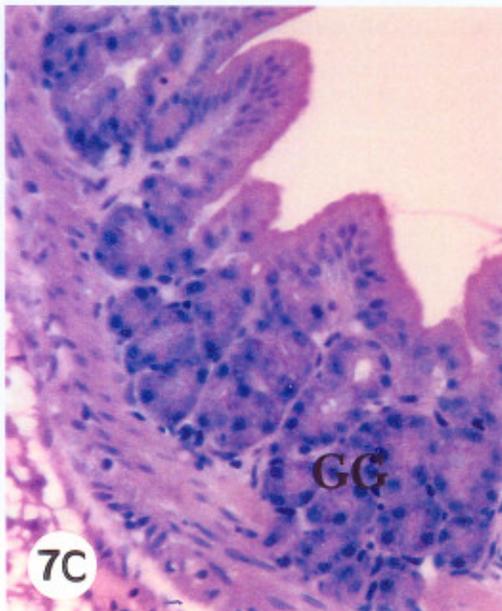
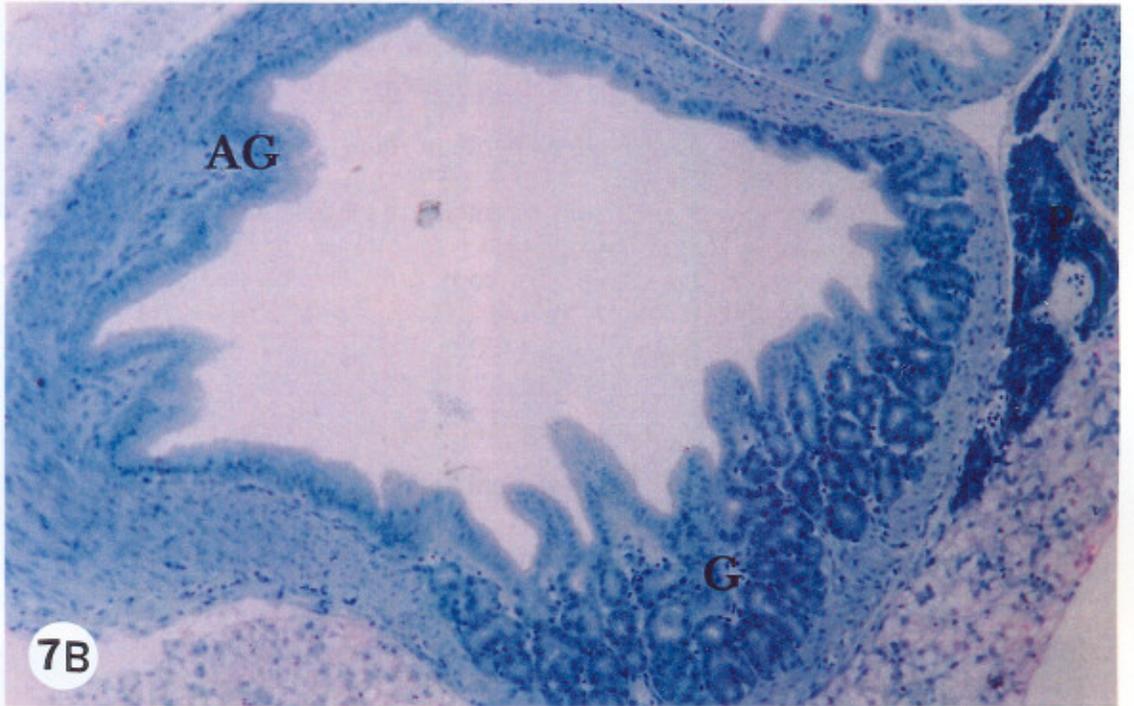
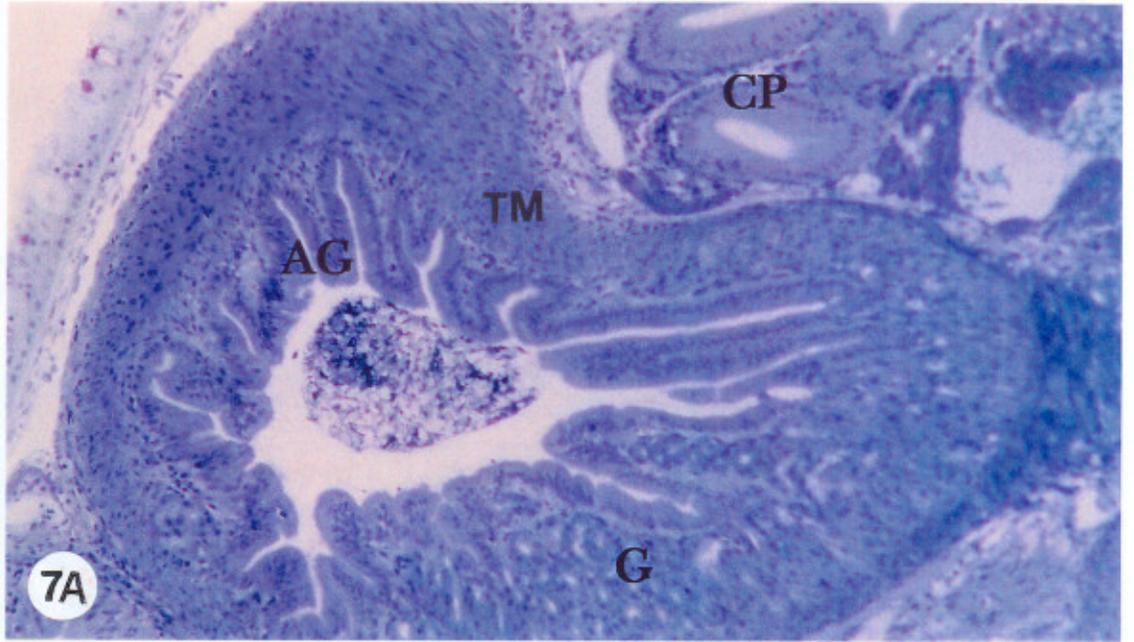


Figura 8 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* aos 12 dias do início a alimentação exógena. Larva com 16 dias de vida.

Figura 8A – Larva de pacu alimentada com náuplios *Artemia* (tratamento A), evidenciando o pâncreas (P) e as vilosidades no intestino com presença de células caliciformes (CC). 200x. At/Fuc.

Figura 8B – Larva de pacu alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena (tratamento A12-dieta C-I), evidenciando o pâncreas (P) com grânulos de zimogênio acidófilos, e secções transversais dos cecos pilóricos (CP). 200x. At/Fuc.

Figura 8C – Larva de pacu alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena (tratamento A12-dieta C-I), evidenciando grânulos maduros de zimogênio (Z). 1000x. At/Fuc.

Figura 8D – Larva de pacu mantida em jejum evidenciando o intestino (I) com mucosa plana. 200x. At/Fuc.

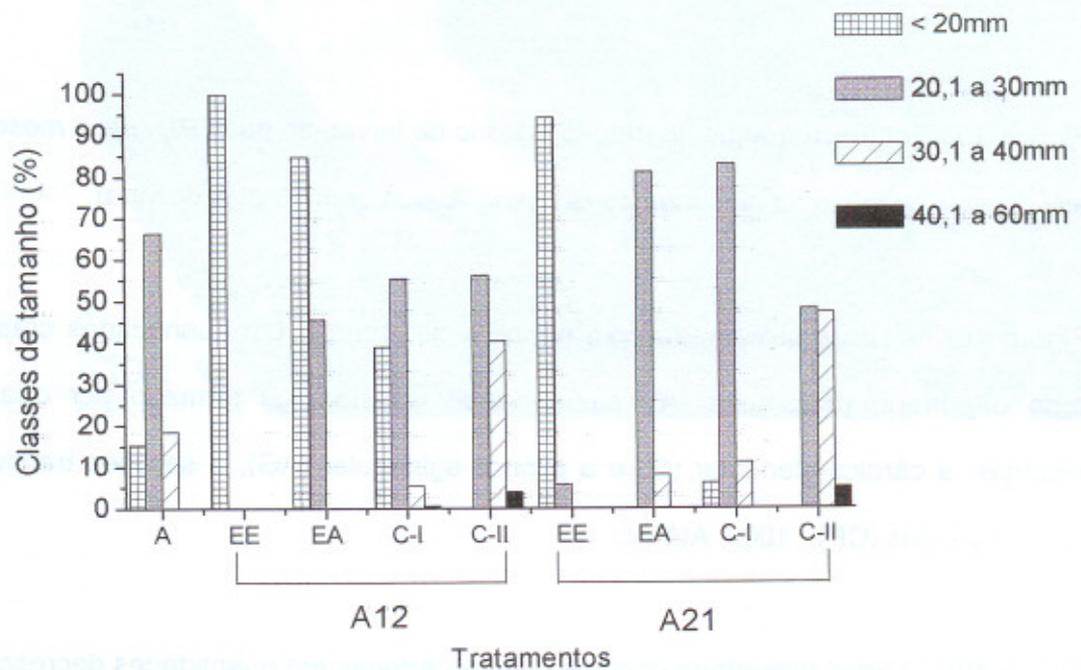


Figura 9. Distribuição das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* em classes de tamanho (mm) obtida ao final de 35 dias do início da alimentação exógena. A: somente alimento vivo; A12 e A21 significam alimento vivo por 12 e 21 dias, respectivamente, seguido exclusivamente pelas dietas secas, experimentais ou comerciais. EE: dieta experimental microencapsulada; EA: dieta experimental microaglutinada; C-I: dieta comercial HatchFry Encapsulon; C-II: dieta comercial FryFeed Kyowa B.

Figura 10 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* aos 15 dias do início da alimentação exógena (larvas com 19 dias de vida).

Figura 10A – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades crescentes por todo o período (tratamento **A**), evidenciando o estômago formado por duas câmaras distintas, a cárdica-glandular (G) e a pilórica-aglandular (AG); e seções transversais dos cecos pilóricos (CP). 100x. At/Fuc.

Figura 10B - Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena, seguido exclusivamente da dieta seca (tratamento **A12-dieta EE**), evidenciando o estômago ainda em forma sacular com região glandular delgada (G). 100x. At/Fuc.

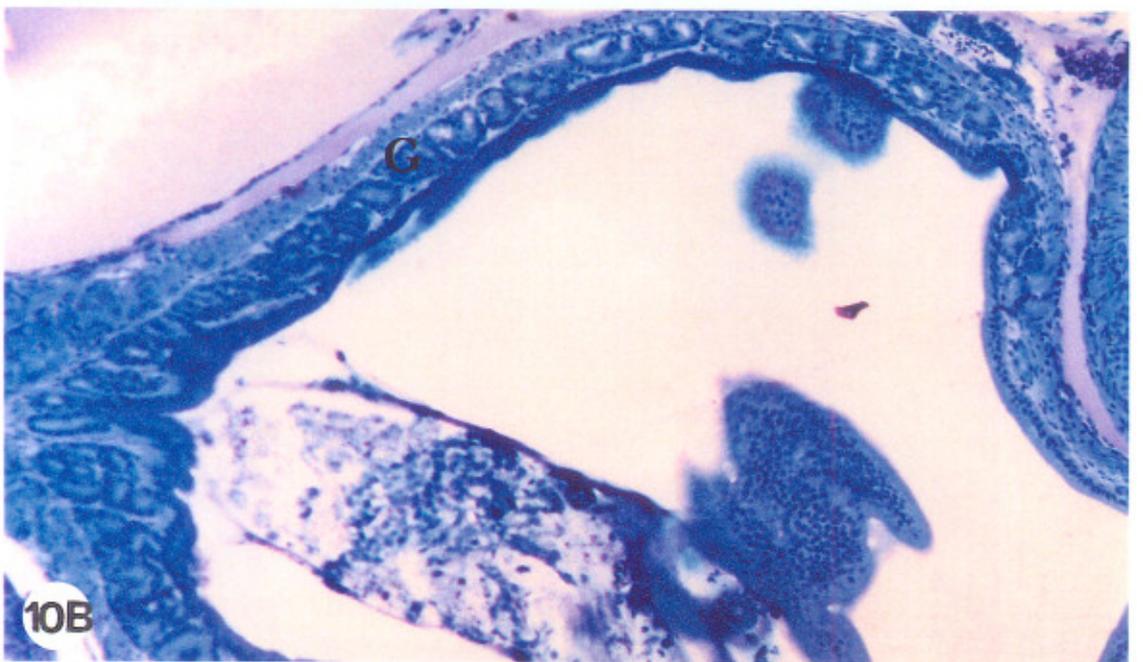
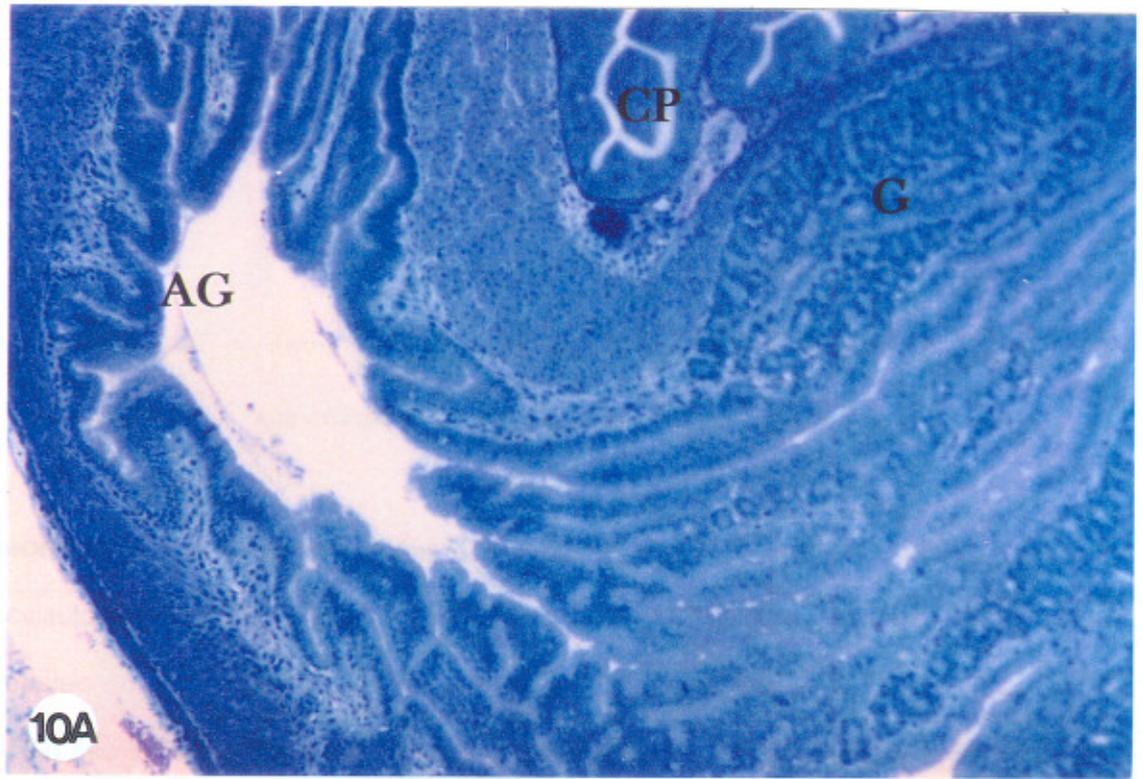


Figura 11- Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* após 21 dias do início da alimentação exógena (larvas com 25 dias de vida).

Figura 11A – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena, seguido exclusivamente da dieta seca - tratamento **A12-dieta C-II**, evidenciando o estômago formado pelas regiões cárdica-glandular (G) e pilórica-aglandular (AG), cecos pilóricos (CP) e pâncreas (P). 40x. At/Fuc.

Figura 11B – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 6º e 12º dia do início da alimentação exógena, seguido exclusivamente da dieta seca - tratamento **A12-dieta C-I**, evidenciando o estômago de forma ainda sacular com região glandular (G) e aglandular (AG), e cecos pilóricos (CP). 40x. At/Fuc.

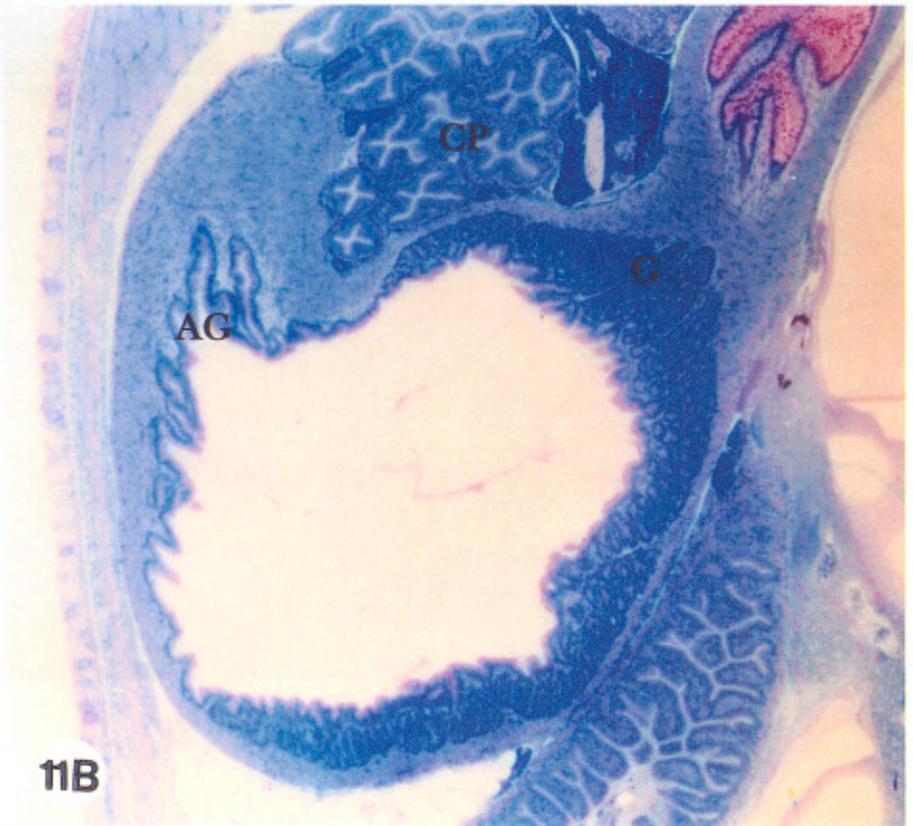
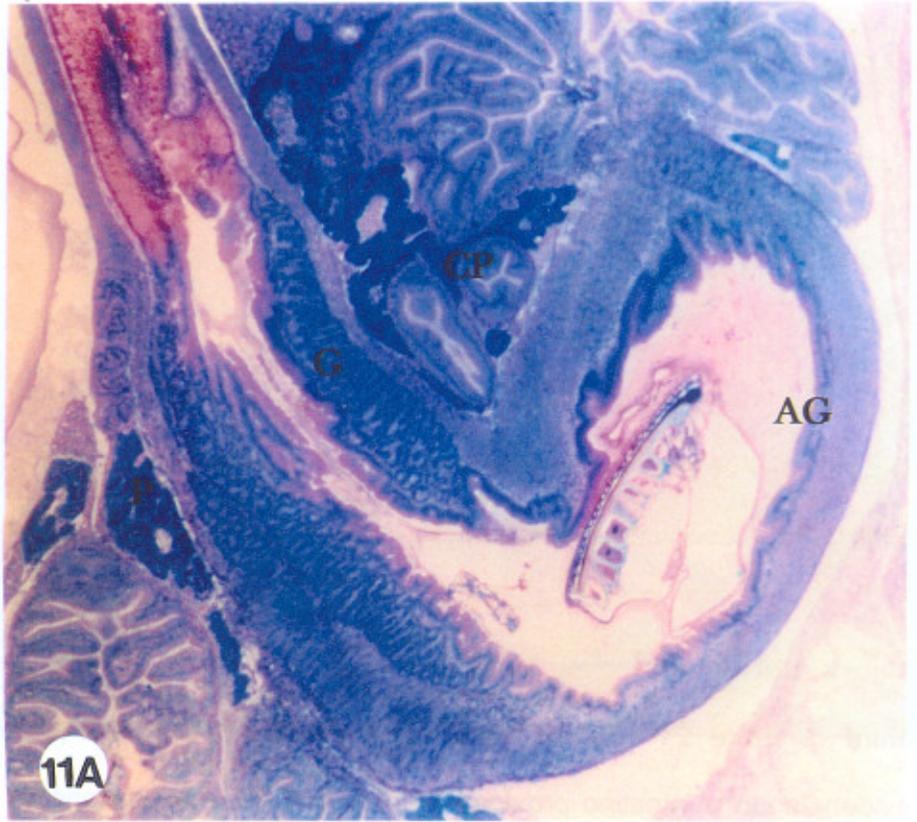


Figura 12 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* após 21 dias do início da alimentação exógena (larvas com 25 dias de vida).

Figura 12A - Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades decrescentes entre o 15º e 21º dia do início da alimentação exógena (tratamento **A21-dieta EE**), evidenciando o intestino proximal (IP) em comunicação (asterisco) com os cecos pilóricos (CP). 100x. At/Fuc.

Figura 12B – Larva alimentada com náuplios de *Artemia* em quantidades crescentes por todo o período (tratamento **A**) evidenciando o fígado (F) e pâncreas intra hepático (PIH). 200x. At/Fuc.

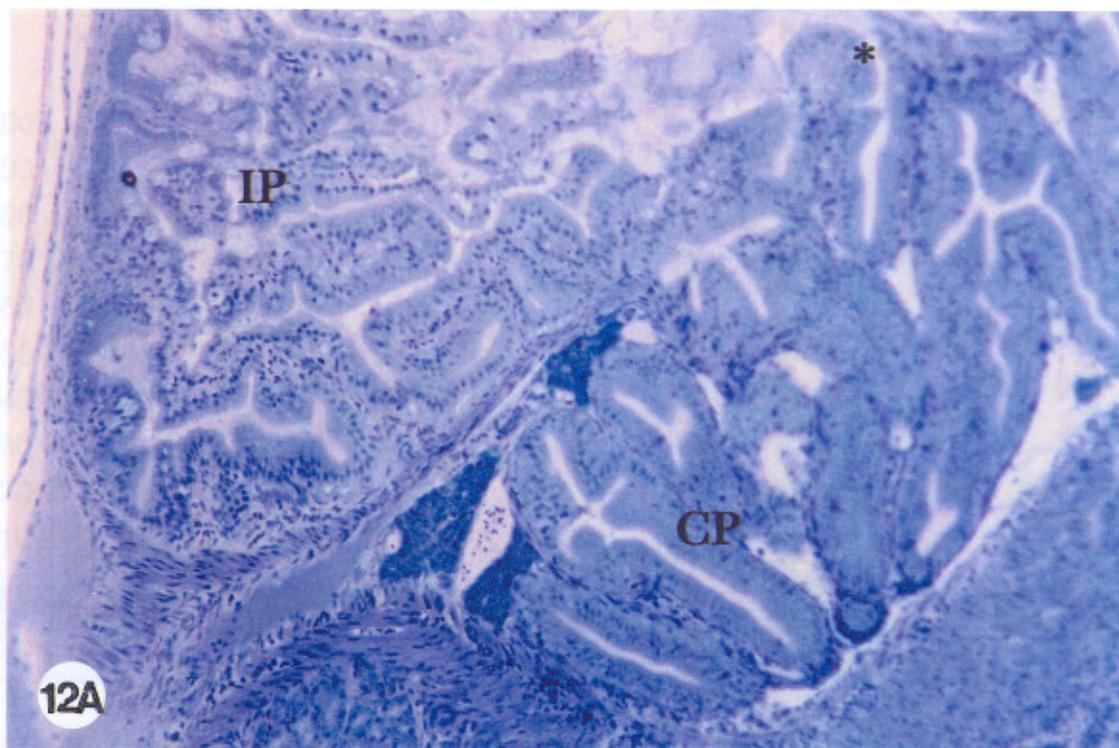
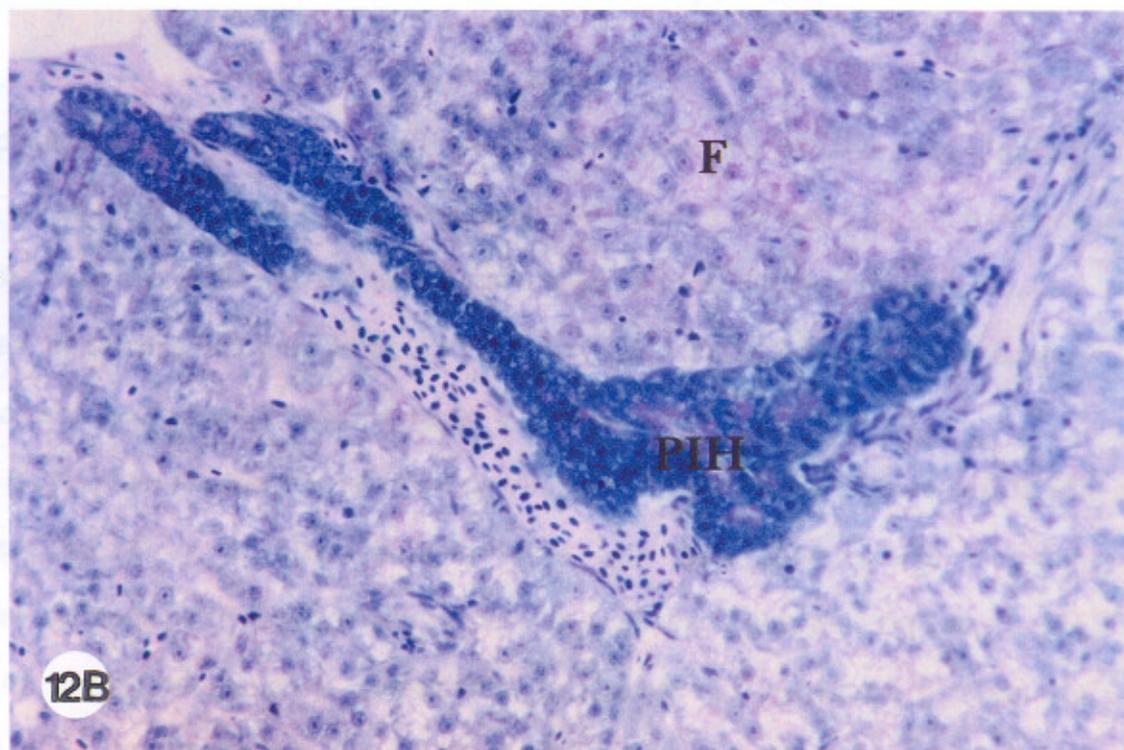


Figura 12. Vezetas histicas das zonas de submucosa da parede do útero *Proechinus micropneumatis*, ao fim de 25 dias de ciclo de reprodução vaginal. A imagem obtida nos A12 e A21 significam imagens obtidas nos 12 e 21 dias, respectivamente, segundo exclusivamente pelas técnicas utilizadas na obtenção. FE: zona experimental não manipulada; EA: zona experimental manipulada; CP: zona externa (zona de submucosa); IP: zona interna (zona de submucosa). Letras seguitas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).



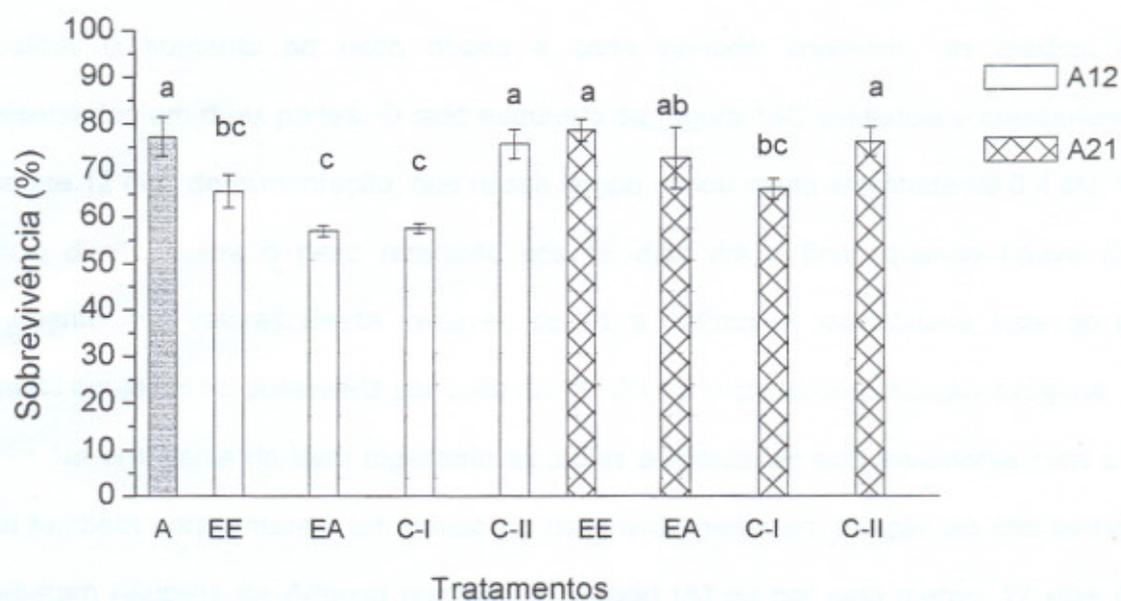


Figura 13. Valores médios das taxas de sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, ao final de 35 dias do início da alimentação exógena. A: somente alimento vivo; A12 e A21 significam alimento vivo por 12 e 21 dias, respectivamente, seguido exclusivamente pelas dietas secas, experimentais ou comerciais. EE: dieta experimental microencapsulada; EA: dieta experimental microaglutinada; C-I: dieta comercial HatchFry Encapsulon; C-II: dieta comercial FryFeed Kyowa B. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

O desempenho dos animais com o fornecimento exclusivo da dieta seca (FryFeed Kyowa B) revelou resultados inesperados (Figura 14). Embora as taxas de sobrevivência tenham sido baixas, 11% contra 70% com a alimentação à base de náuplios ($P < 0,05$), pela primeira vez foi demonstrado que as larvas de pacu foram capazes de sobreviver apenas com a dieta seca desde a primeira alimentação (Figura 14B).

As larvas que receberam náuplios de *Artemia* apresentaram sempre um maior crescimento ($P < 0,05$), e as alimentadas somente com dieta seca praticamente não aumentaram as medidas de comprimento e peso nos primeiros seis dias da alimentação (Figuras 14A e 14C), mantendo-as semelhantes às médias das larvas que estavam em jejum ($P > 0,05$). A partir de nove dias, as larvas em jejum sofreram uma diminuição no valor do peso e as alimentadas com a dieta seca começaram a evidenciar ligeiros ganhos em

comprimento e peso, até o final. Como houve um grande aumento no valor absoluto do peso, que foi de 0,4mg da larva inicial até cerca de 140mg ao final de 36 dias, para melhor visualizar o aumento no peso obtido a cada período analisado, as médias foram apresentadas em duas partes. O lado esquerdo da Figura 14C evidencia o crescimento em peso até 12 dias de alimentação, que nesse tempo variou numa amplitude de 0,4 até 11mg; o lado direito ilustra o peso referente aos 12 dias até o final, quando houve grande incremento nos valores dessa variável, de 11 a 140mg. A mortalidade total do grupo mantido em jejum foi observada por volta do 11º dia do início da alimentação exógena.

Na ontogenia do trato digestório as larvas alimentadas exclusivamente com a dieta seca também apresentaram um atraso no desenvolvimento em relação ao das larvas que receberam náuplios de *Artemia* por todo o período (A) ou por pelo menos 12 dias (A12), principalmente quanto a formação do estômago. Animais com 30 dias após o início da alimentação exógena apresentavam o estômago ainda de forma sacular com delgadas regiões glandular e aglandular (Figuras 15A e 15B). O intestino, embora tenha se desenvolvido mais lentamente, apresentou vilosidades com vacúolos e inclusões supranucleares aparentes (Figura 15C).

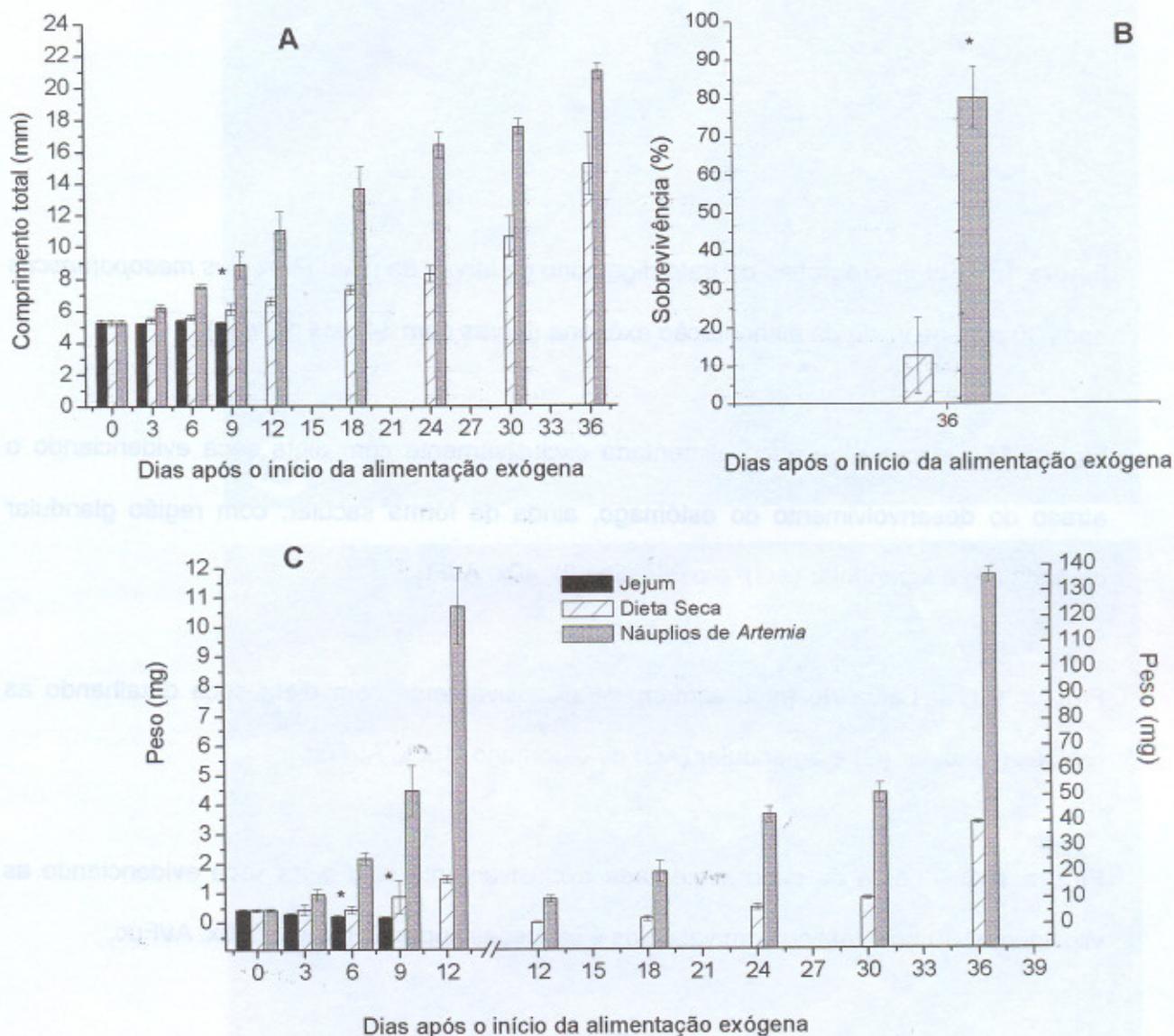


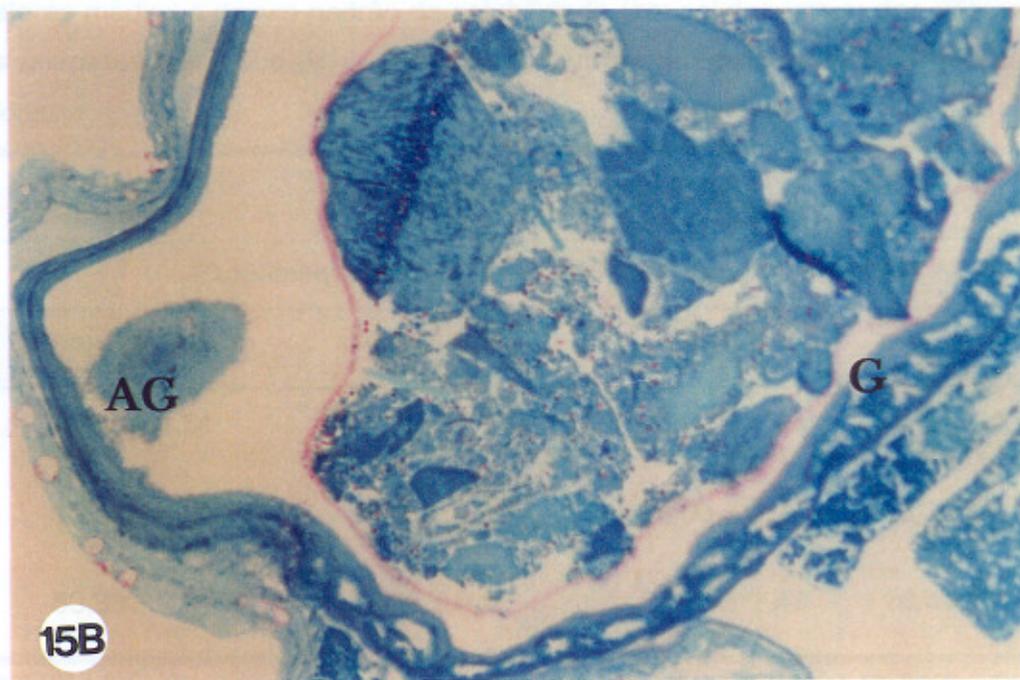
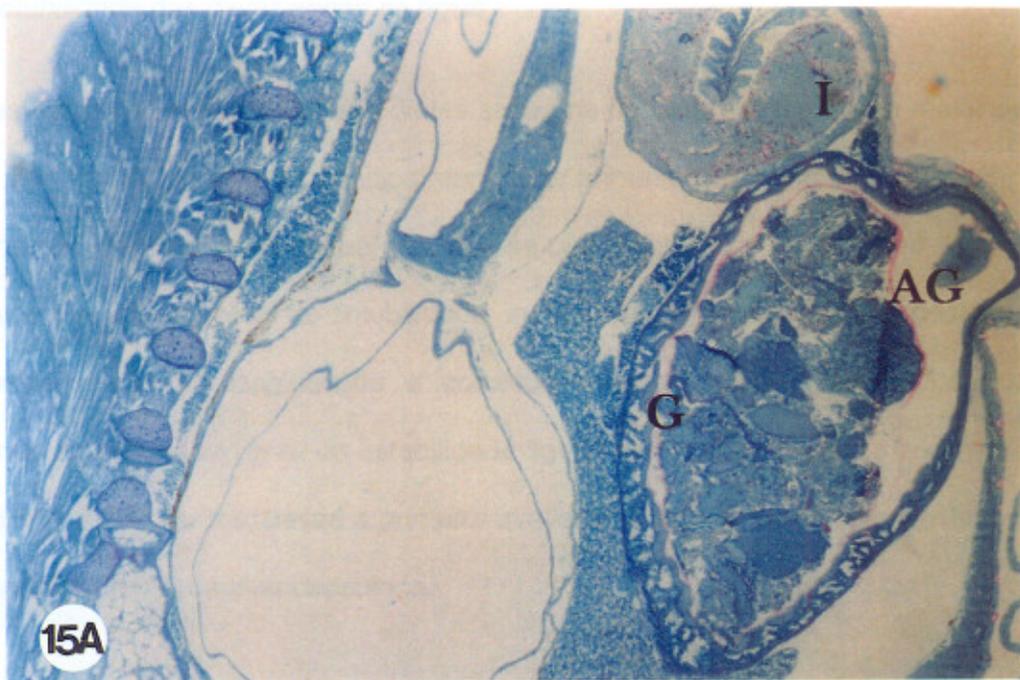
Figura 14. Valores médios de comprimento total, peso úmido e sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentadas exclusivamente com dieta seca ou náuplios de *Artemia* e larvas mantidas em jejum. C: crescimento em peso até 12 dias de alimentação (eixo y da esquerda) e de 12 a 36 dias (eixo y da direita). A e C: animais alimentados com náuplios apresentaram sempre maiores médias ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; asterisco (*) expressa maior média ($P < 0,05$) para as larvas que receberam dieta seca em relação às larvas mantidas em jejum. B: (*) expressa maior média de sobrevivência para as larvas que receberam náuplios ($P < 0,05$).

Figura 15 - Fotomicrografias do trato digestório de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* após 30 dias do início da alimentação exógena (larvas com 34 dias de vida).

Figura 15A – Larva de pacu alimentada exclusivamente com dieta seca evidenciando o atraso do desenvolvimento do estômago, ainda de forma sacular, com região glandular delgada (G) e aglandular (AG), e o intestino (I). 40x. At/Fuc.

Figura 15B – Larva de pacu alimentada exclusivamente com dieta seca detalhando as regiões glandular (G) e aglandular (AG) do estômago. 100x. At/Fuc.

Figura 15C – Larva de pacu alimentada exclusivamente com dieta seca evidenciando as vilosidades (V) no intestino com vacúolos e inclusões supranucleares. 100x. At/Fuc.



Análise de solubilidade das dietas secas na água

Os resultados de solubilidade das dietas secas na água indicaram que a maior parte da lixiviação dos nutrientes ocorreu principalmente nos primeiros 30 minutos (Tabela 3). De outra maneira, comparando-se as dietas, verificou-se que a comercial II (Fry Feed Kyowa B) apresentou um menor percentual de solubilidade, independente do tempo de exposição. Já as dietas experimental microaglutinada e comercial I apresentaram resultados quase similares, tendo a primeira um grau de estabilidade ligeiramente maior. A dieta que mostrou uma maior perda de nutrientes, desde a primeira avaliação aos 30 minutos em contato com a água, foi a experimental microencapsulada.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da solubilidade (em sólidos totais) das diferentes dietas secas utilizadas como substituto do alimento vivo na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus*.

Tempo (minutos)	Solubilidade das dietas (%)			
	Experimentais		Comerciais	
	Microencapsulada (EE)	microaglutinada (EA)	Dieta I	Dieta II
30	46,50 ± 1,51	25,35 ± 1,40	28,90 ± 1,26	15,45 ± 0,72
60	50,64 ± 1,15	24,72 ± 0,96	29,06 ± 1,32	15,30 ± 0,24
120	50,39 ± 2,07	23,71 ± 0,26	29,79 ± 1,43	16,44 ± 0,09

Dietas comerciais I e II: HatchFry Encapsulon, Argent e FryFeed Kyowa B, Japão, respectivamente.

4. Discussão

A retirada do alimento vivo foi impactante na sobrevivência dos animais, que chegou a sofrer uma redução em até 62% no primeiro experimento (29% em A9D contra 78% no controle A - náuplios de *Artemia* por todo o período). Independentemente dos náuplios terem sido substituídos aos nove (larvas com 3mg) ou 27 dias (89mg) após o início da

alimentação exógena (IAE) houve diminuições nas taxas de crescimento em relação ao controle A. Larvas com cerca de 3mg praticamente não manifestaram crescimento algum, durante seis dias logo após a substituição do alimento, e larvas nas substituições mais tardias também tiveram o crescimento prejudicado, mas em menor proporção. Posteriormente a essa fase de adaptação, os animais até retomaram ao crescimento, porém o controle "A" manifestou os melhores resultados. Hung et al. (2002) também verificaram esse efeito da redução na taxa de crescimento quando larvas de *Pangasius bocourti* tiveram o alimento vivo substituído. A interrupção momentânea do crescimento também foi observada por Person Le Ruyet et al. (1993) com larvas de "sea bass" *Dicentrarchus labrax*, por um período de cinco dias, quando o alimento vivo foi substituído mais precocemente (23 dias), enquanto que animais na substituição mais tardia (29 dias) se adaptaram mais facilmente à dieta seca, como constatado também no presente estudo.

No segundo experimento, os resultados mostraram uma outra visão da possibilidade da utilização de dieta seca na larvicultura do pacu. Larvas A12 que receberam a dieta C-II (FryFeed Kyowa B) não tiveram o crescimento nem a sobrevivência prejudicados com a substituição total do alimento vivo após 12 dias do início da alimentação exógena (~13mg de peso úmido). Por outro lado, com as demais dietas a performance dos animais não foi a mesma, chegando a ser verificadas, ao final de 35 dias do início da alimentação exógena (IAE), médias de peso entre 27 a 601mg para A12-dieta experimental microencapsulada e A12-dieta comercial II, respectivamente. A taxa de sobrevivência também variou consideravelmente entre os tratamentos do grupo A12, cerca de 57% (dietas EA e C-I) a 76% (dieta C-II). Hung et al. (2002) sugere que baixas taxas de sobrevivência com a dieta seca podem estar relacionadas à qualidade e digestibilidade da mesma ou devido ao desenvolvimento rudimentar do sistema digestório nas primeiras alimentações. Larvas A12 no momento da substituição (~13mg) apresentavam o trato digestório com características ontogenéticas semelhantes, i.e. o estômago apresentando as regiões glandular e aglandular e o intestino com vilosidades desenvolvidas em toda a sua extensão. Nove dias após a supressão total do alimento vivo (amostragem aos 21 dias), entre as larvas do grupo A12,

apenas os animais que receberam a dieta C-II apresentavam o estômago em duas câmaras já distintas, em cárdica e pilórica. Provavelmente, a eficiência das dietas secas parece ter sido decisiva para as larvas A12 expressarem sua habilidade para o aproveitamento desse alimento, e conseqüentemente o potencial para o crescimento e garantia da sobrevivência. Resultados insatisfatórios quanto o uso de dieta seca na criação das larvas, muitas vezes, podem ser atribuídos mais às características da dieta do que à incapacidade digestiva das mesmas (YÚFERA et al., 1999). Cahu e Zambonino (2001) relatam que, em larvas de peixes marinhos, as enzimas pancreáticas digestivas são detectadas antes da abertura da boca e que a síntese das enzimas é induzida por mecanismos de secreção no pâncreas e não pela simples presença do alimento no trato digestivo. Segundo os mesmos, dietas inadequadas podem atrasar o início destes mecanismos de secreção. Fernandez-Díaz e Yúfera (1995) testando diferentes tipos de microcápsulas para larvas de *Sparus aurata*, comentaram que as características das dietas podem influenciar a aceitabilidade e o aproveitamento da partícula.

A importância da dieta também foi evidenciada mesmo quando a substituição do alimento vivo ocorreu mais tardiamente, quando diferentes respostas de crescimento foram obtidas entre as dietas utilizadas. Larvas A21 sofreram reduções nas taxas de crescimento em relação aos ganhos obtidos com controle A, exceto as larvas A21-dieta C-II, que mesmo no período da alimentação mista (náuplios em quantidades decrescentes), conseguiram manter o crescimento num ritmo semelhante ao das larvas do controle A. No final de 35 dias, larvas A21-dietas EA e C-I atingiram médias de peso semelhantes a do controle A, larvas A21-dieta EE, o menor valor, e larvas A21-dieta C-II, a maior média. Os resultados da solubilidade das dietas na água, um dos parâmetros que determinam a qualidade do alimento, mostraram-se intimamente relacionados com o desempenho das mesmas como alimento substituto. A dieta seca que melhor se sobressaiu nos resultados de crescimento dos animais (C-II FryFeed Kyowa B) foi a que apresentou uma maior estabilidade na água, independente do tempo de permanência nesse meio, denotando uma maior capacidade de retenção dos nutrientes na partícula. A dieta experimental microencapsulada foi a que

demonstrou um maior percentual de lixiviação dos nutrientes, praticamente o dobro do valor observado com a dieta experimental microaglutinada, indicando que o protocolo utilizado na elaboração da dieta EE deve ser aprimorado. As dietas secas para larvas devem possuir algumas características específicas aos diferentes estágios do desenvolvimento larval, como tamanho de partícula, gravidade específica e um bom balanceamento nutricional com ingredientes facilmente digeríveis; além da necessidade de serem atrativas e estáveis na água por um tempo relativamente longo para permitirem mínima lixiviação dos nutrientes (KANAZAWA, 1988).

Além da qualidade da dieta interagindo na determinação do melhor momento para a retirada do alimento vivo, outro fator que parece ter influenciado nas respostas desse procedimento foi o tamanho que os animais apresentavam no momento da transição do alimento. Comparando-se os resultados do tratamento A21- dieta C-I obtidos entre o experimento I e II, o melhor desempenho de crescimento foi obtido no segundo experimento, mesmo que as condições de criação tenham sido semelhantes (a dieta seca, a idade e o momento para o início da substituição do alimento vivo) em ambas as situações. Os animais possuíam pesos diferentes no momento da substituição, cerca de 27 e 45mg para as larvas A21 do primeiro e segundo experimento, respectivamente. As larvas do primeiro experimento não alcançaram o crescimento final obtido no respectivo controle A, e larvas do segundo experimento apresentaram médias de peso final estatisticamente semelhantes às do seu controle. Essa diferença de tamanho foi provocada pela quantidade de náuplios fornecida às larvas, que foi praticamente o dobro no segundo experimento, no intervalo do 15º ao 21º dia. Embora em ambos os experimentos tenham sido observadas sobras de náuplios, provavelmente a principal causa de variação entre eles foi a quantidade de náuplios disponibilizada, que refletiu no crescimento dos animais e, conseqüentemente, no desempenho dessa dieta seca como alimento substituto. Parra e Yúfera (2000) comentaram sobre o efeito da densidade de presa na biomassa final produzida de larvas de *Sparus aurata*. Os autores verificaram que a taxa de ingestão de rotíferos foi sempre mais reduzida na menor concentração de presa.L⁻¹ testada, i.e. taxas de ingestão da ordem de

30% contra 70 a 80%. Níveis alimentares com organismos vivos devem ser adequados para cada espécie no sentido de não incorrer a desperdícios, mas de favorecer a um crescimento ótimo relacionado aos benefícios econômicos.

A diminuição nas quantidades de náuplios de *Artemia*, entre seis e 12 dias, revelou algumas diferenças no desenvolvimento do trato digestório entre as larvas A12 e as do controle A, que continuaram recebendo os náuplios em quantidades crescentes. Embora a análise estatística não tenha revelado diferenças entre as médias de peso, um crescimento ligeiramente maior para as larvas A e A21 contra o grupo A12 pôde constatado, e na avaliação histológica, larvas A12 apresentaram-se num estágio pouco menos desenvolvido que as do controle A quanto a formação do estômago. Kestmont e Awaïss (1989) consideraram o nível de alimentação um fator fundamental, principalmente para aquelas espécies que se desenvolvem rapidamente durante as primeiras semanas de vida.

Para as larvas que receberam as dietas experimentais e comercial I, o estágio do desenvolvimento das larvas foi decisivo nas respostas de crescimento e sobrevivência, larvas com cerca de 45 mg responderam melhor à substituição do alimento vivo que larvas mais novas, com 13mg. Segundo Person Le Ruyet et al. (1993), o sucesso para a substituição do alimento vivo depende do estágio do desenvolvimento das larvas bem como a saúde das mesmas; e Rosenlund et al. (1997) consideraram que o peso pode ser melhor que a idade para indicar o estágio de desenvolvimento da larva, fatos também observados no presente estudo.

Já as larvas que receberam a dieta comercial II (Fry Feed Kyowa B), essas conseguiram apresentar resultados satisfatórios tanto na substituição tardia (45mg), como na precoce (13mg). Embora as larvas A12-dieta C-II tenham sofrido reduções nas taxas de crescimento logo após a substituição do alimento vivo, esses animais não tiveram a sobrevivência prejudicada e mostraram um potencial de recuperação do crescimento e, no final, alcançaram os mesmos patamares de peso que as larvas A21-dieta C-II, ambos com valores maiores que o peso no controle A. Além da importância do estágio de desenvolvimento das larvas para a substituição do alimento vivo, Person Le Ruyet et al.

(1993) também comentaram a obtenção de resultados aceitáveis quando esse procedimento fora realizado após a passagem do tamanho considerado crítico, que para larvas "sea bass" *Dicentrarchus labrax* parece ser entre 3 a 5mg. Duray e Bagarinao (1984) conseguiram bons resultados na larvicultura de "milkfish" *Chanos chanos* com o uso do alimento seco quando as larvas atingiram um peso de 2 mg após alimentação com rotíferos.

Para larvas de pacu, o menor tamanho (até o momento) para substituir o alimento vivo, satisfatoriamente, pode estar próximo de 10mg, dependendo da eficiência da dieta seca. Larvas de pacu com 1,5mg (3 dias do início da alimentação exógena -IAE), 3,5 mg (6 dias) e 10mg (9 dias) praticamente não cresceram recebendo dieta experimental microaglutinada, até completar 20 dias de experimento (JOMORI, 1999). Larvas de pacu com 1,5mg (6 dias do IAE), 3mg (9 dias), 8mg (12 dias) e 7mg (15 dias) foram alimentadas com dieta comercial microencapsulada até completar 20 dias e apresentaram um crescimento bem menor em relação ao controle náuplios de *Artemia* por todo período (TESSER et al., 2005). Usando a dieta mais eficiente do presente estudo, a comercial Fry Feed Kyowa B, Jomori et al. (2005 – Capítulo III da presente Tese) testaram para larvas de pacu a substituição do alimento vivo em larvas com 2mg (6 dias IAE). Pela técnica dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, os autores verificaram a retenção dos nutrientes dessa dieta no tecido larval, mas ganhos expressivos de peso só foram verificados seis dias após a transição alimentar; e mesmo os animais tendo recuperado o crescimento, a taxa de sobrevivência foi prejudicada, 40% contra ~70% no controle; com a substituição do alimento vivo usando larvas com cerca de 10mg (12 dias do IAE), os autores verificaram os mesmos resultados que os obtidos no presente estudo, e constataram ainda que o início para a escolha voluntária dos alimentos, vivo ou seco, também começou a ser verificado a partir dessa fase.

A ontogenia do trato digestório observada entre larvas de diferentes tamanhos sustenta o sucesso obtido na substituição do alimento vivo para larvas com cerca de 13mg. Entre larvas que possuíam 2mg (6 dias) e 13mg (12 dias) constatou-se a ocorrência de uma diferenciação muito expressiva nesse fase, como da região presuntiva do estômago quase

semelhante à das larvas iniciais para o início da formação da segunda câmara gástrica, com presença de glândulas gástricas; do intestino com a formação de pequenas vilosidades na região anterior para o desenvolvimento de vilosidades ocupando quase toda a luz e em toda a extensão do intestino. Mesmo larvas com um peso intermediário, cerca de 7mg, também apresentaram-se num estágio de desenvolvimento bem anterior que as larvas com 13mg, principalmente quanto a formação do estômago (JOMORI et al., 2005 Capítulo I da presente Tese).

A substituição total do alimento não foi um procedimento tecnicamente eficiente. As larvas evidenciaram um expressivo atraso no desenvolvimento do trato digestório em relação ao das larvas que receberam alimento vivo. Mas, sobrevivência da ordem de 11% foi verificada. Resultados diferentes foram relatados por Tesser et al. (2005) que constataram a ocorrência de mortalidade total no grupo de larvas alimentadas exclusivamente com dieta seca, num tempo similar ao das larvas em jejum (16º dia de vida). As diferenças entre esses resultados podem ter sido pela qualidade das dietas secas utilizadas. De maneira geral, estudos que mostraram a possibilidade da substituição total do alimento vivo na criação das larvas têm revelado também resultados de crescimento e sobrevivência inferiores em relação aos demais regimes alimentares testados (LAZO et al., 2000 com larvas de *Sciaenops ocellatus*; HUNG et al., 2002 com larvas de *Pangasius bocourti*), e a mudança alimentar precoce, cujo período varia consideravelmente entre as espécies, nem sempre tem sido igual ou melhor que o controle (HAMLIN e KLING, 2001; CALLAN, 2003).

Em resumo, a eficiência da dieta seca foi decisiva para a larva expressar seu potencial de crescimento após a substituição do alimento vivo. As respostas obtidas no presente estudo foram bastante satisfatórias, revelando para larvas de pacu a possibilidade de mudar o alimento, do vivo para o seco, sem que sejam prejudicados os resultados de crescimento e sobrevivência dos animais. Essas informações abrem perspectivas quanto ao uso da dieta seca na larvicultura do pacu e sugere a continuidade das pesquisas quanto a

elaboração de dietas secas para a espécie e estratégias alimentares visando o uso dos alimentos, vivo e seco, de maneira mais eficiente e econômica na produção comercial.

5. Agradecimentos

O autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão de Bolsa de Estudo e Reserva Técnica para a realização do presente trabalho.

6. Referências Bibliográficas

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. **Association of official Agriculture Chemistry**. Ailington, V.A. 1984.

APPELBAUM, S.; VAN DAMME, P. The feasibility of using exclusively artificial dry feed for the rearing of Israeli *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) larvae and fry. **Journal Applied Ichthyology**, Hamburgo, v. 4, p. 105-110, 1988.

BELTRAN, R. R.; CHAMPIGNEULLE, A. Studies on the improvement of the first feeding on a dry diet for *Coregonus lavaretus* L. larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 102, p. 319-331, 1992.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v.200, p. 161-180, 2001.

CALLAN, C. Reducing *Artemia* use in the culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, p. 585-595, 2003.

DURAY, M.; BAGARINAO, T. Weaning of hatchery-bred milkfish larvae from live food to artificial diets. **Aquaculture**. Amsterdam, v.41, p.325-32. 1984.

FENANDEZ-DÍAZ, C.; YÚFERA, M., Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae to break down dietary microcapsules. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 134, p. 269-278, 1995.

- FENANDEZ-DÍAZ, C; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. **Marine Biology**, Londres, v. 118, p. 323-328, 1994.
- HAMLIN, H. J.; KLING, L. J. The culture and early weaning of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) using a microparticulate diet. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, p. 61-72, 2001.
- HUNG, L. T., TUAN, N. A., CACOT, P., LAZARD, J. Larval rearing of the Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 212, p. 115-127, 2002.
- JOMORI, R. K. **Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial.** Jaboticabal. 1999. 70 f. Trabalho de graduação em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.
- KANAZAWA, A.. Formulated microdiets. In: Fish Nutrition and Mariculture. Edited by WATANABE, T. International Cooperation Agency, Tokyo, Japan, p. 132-146, 1988.
- KESTMONT, P.; AWAISS, A. Larval rearing of the gudgeon, *Gobio gobio* L under optimal conditions of feeding with the rotifer, *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 83, p. 305-318, 1989.
- MACEDO-VIEGAS, E. M.; Portella, M.C.; CARNEIRO, D. J. Utilization of fish protein hydrolysate in artificial diets for pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Journal of Applied Aquaculture**, Frankfort, v.14, n. 3/4, p.101-112. 2003.
- LAZO, J. P.; DINIS, M. T.; HOLT, G. J.; FAULK, C.; ARNOLD, C. R. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 188, p. 339-351, 2000.
- LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Oxford, v. 33, p. 80-88, 2000.
- PARRA, G., YÚFERA, M. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 243 , p. 1-15, 2000.

PLANAS, M., CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 171-190, 1999.

PERSON LE-RUYET, J. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. **Adv. Trop. Aquacult.**, v. 9, n. 625-42, 1989.

PERSON LE-RUYET, J.; ALEXANDRE, J. C.; THÉBAUD, I.; MUGNIER, C. Marine fish larvae feeding: Formulated diets or liver prey? **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 24, n. 2, p. 211-224, 1993.

ROSENLUND, G.; STOSS, J.; TALBOT, C. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. **Aquaculture**. v.155, p. 183-191, 1997.

TESSER. M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA. M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated. **Journal of Applied Aquaculture**, v. Frankfort, v. 17, n. 2, p. 47-59, 2005.

YÚFERA, M.; PASCUAL, E.; FERNADEZ-DÍAZ, C. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 249-256, 1999.

WATANABE T.; KIRON, V. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124, p. 223-251, 1994.

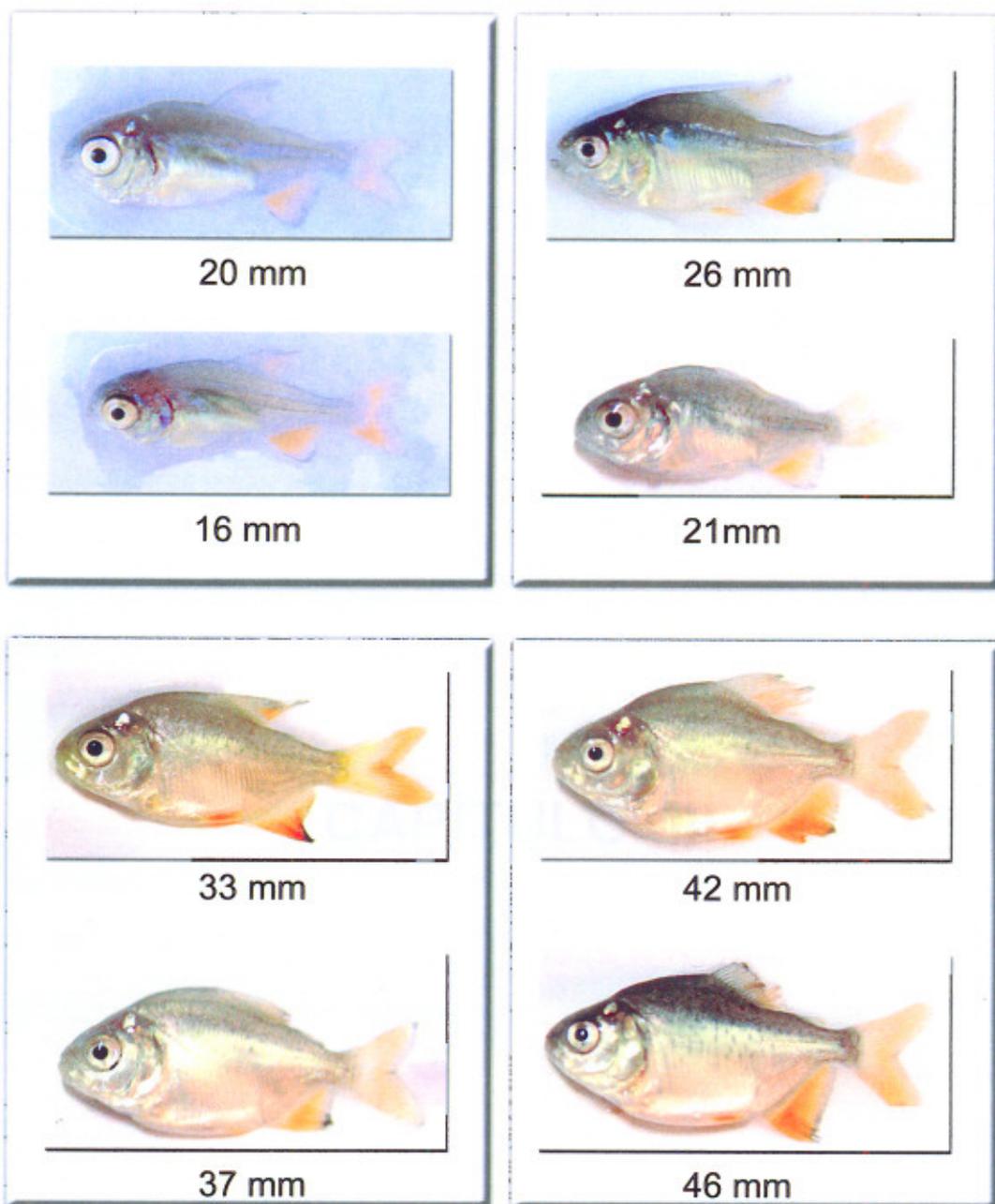
ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Editora Prentice – Hall. 1998. 930 p.



Anexo 1. Descrições de espécies de peixes
lançandose em ambientes aquáticos e
o modo de captura e conservação.

ANEXO





Anexo 1. Exemplos de pacu *Piaractus mesopotamicus* de diferentes tamanhos, em comprimento total (mm), obtidos ao final de 35 dias após o início da alimentação exógena.

Isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Resumo – Os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio têm sido bastante utilizados na identificação das fontes alimentares utilizadas pelos animais. Larvas de peixes, na maioria das espécies, dependem de organismos vivos como alimento inicial por um determinado período, mas o uso de dietas secas na larvicultura também é desejável. Dessa forma, o estudo propôs utilizar a técnica dos isótopos estáveis para verificar o aproveitamento do alimento (vivo e seco) pelas larvas de pacu no decorrer do seu desenvolvimento e identificar o momento em que as larvas passam a utilizar os nutrientes da dieta seca através da retenção dos átomos de carbono e nitrogênio em seus tecidos corporais. Larvas de pacu com cinco dias após a eclosão, iniciando a alimentação exógena (comprimento total de $5,3 \pm 0,2$ mm e peso de $0,43 \pm 0,05$ mg), foram alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* ou dieta seca; receberam alimentação mista por todo o período: náuplios + dieta seca (A+D); ou tiveram os náuplios substituídos por dieta seca após três (A3D), seis (A6D) e 12 dias (A12D) do início da alimentação exógena. Antes da alimentação exógena, a composição isotópica do tecido larval era de $-20,2\text{‰}$ para o $\delta^{13}\text{C}$ e $9,5\text{‰}$ para o $\delta^{15}\text{N}$. Posteriormente, o perfil isotópico do tecido larval mostrou-se intimamente correlacionado com o respectivo tratamento alimentar aplicado, e, ao final de 42 dias de alimentação, as larvas alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* ($\delta^{13}\text{C} = -15,1 \pm 0,2\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N} = 4,7 \pm 0,2\text{‰}$) atingiram valores de $-12,7$ e $7,0\text{‰}$ para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente; e as larvas que receberam apenas a dieta seca ($\delta^{13}\text{C} = -25,0 \pm 0,1\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N} = 7,4 \pm 0,2\text{‰}$) apresentaram valores de $-22,7\text{‰}$ para o $\delta^{13}\text{C}$ e $9,6\text{‰}$ para o $\delta^{15}\text{N}$. A técnica dos isótopos estáveis foi bastante precisa, e claramente puderam ser definidos os momentos em que as larvas utilizaram os náuplios de *Artemia* como fonte alimentar e, posteriormente, a dieta seca. No caso da dieta seca, diferentes momentos para o início da retenção dos nutrientes desse alimento no tecido larval foram revelados, e animais com cerca de 10mg peso úmido mostraram-se capacitados para o aproveitamento do alimento seco (A12D), bem como para o início da escolha voluntária desse alimento (A+D).

Palavras Chaves: *Piaractus mesopotamicus*, náuplios de *Artemia*, dieta seca, alimentação de larvas, isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)

Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of food incorporation into the larval tissue of pacu *Piaractus mesopotamicus*

Abstract - Stable carbon and nitrogen isotopes have been frequently used in the identification of energy sources in animals. In most fish species, the larvae depend on live organisms as initial food for a certain period; however, the use of dry diets in larviculture is also desirable. Thus, this study proposed the use of the stable isotope technique to track the type of food (live or dry) utilized by pacu larvae during their development, and to identify the moment when the larvae start using nutrients in the dry diet by retaining carbon and nitrogen atoms in their body tissues. 5-day old pacu larvae, in the beginning of exogenous feeding (total length 5.3 ± 0.2 mm and weight 0.43 ± 0.05 mg), were fed a) *Artemia* nauplii or dry diet exclusively; b) received a mixed feeding during the entire period: nauplii + dry diet (A+D); or c) were weaned from nauplii to dry diet after three (A3D), six (A6D), or 12 days (A12D) from the beginning of exogenous feeding. Before commencing exogenous feeding, the isotopic composition of the larval tissue was -20.2‰ for $\delta^{13}\text{C}$, and 9.5‰ for $\delta^{15}\text{N}$. Later, the isotopic profile of the larval tissue proved intimately correlated with the corresponding food treatment applied, and at the end of a 42-day feeding period, larvae fed *Artemia* nauplii alone ($\delta^{13}\text{C}_{\text{nauplii}} = -15.1 \pm 0.2\text{‰}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{nauplii}} = 4.7 \pm 0.2\text{‰}$) reached values of -12.7 and 7.0‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively; larvae that received dry diet alone ($\delta^{13}\text{C}_{\text{dry diet}} = -25.0 \pm 0.1\text{‰}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{dry diet}} = 7.4 \pm 0.2\text{‰}$) showed values of -22.7‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 9.6‰ for $\delta^{15}\text{N}$. The stable isotope technique was considerably precise, and the moments at which the larvae utilized *Artemia* nauplii, and later dry diet as a food source could be clearly defined. In the case of dry diet, different moments at which nutrients from this food began to be retained in the larval tissue were revealed, and animals with a wet weight of about 10mg proved capable of utilizing dry food efficiently (A12D), as well as of choosing this food voluntarily (A+D).

Key words: *Piaractus mesopotamicus*, *Artemia* nauplii, dry diet, larval feeding, stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes

1. Introdução

Sob o aspecto alimentar, larvas de peixe podem ser consideradas até mesmo como "espécies-separadas" de suas formas adultas, pois a alimentação que praticam nessa fase é muito diferente dos recursos utilizam na vida adulta (GERKING, 1994). Logo quando iniciam a alimentação exógena, larvas de muitas espécies não são hábeis ainda para aproveitar com eficiência a dieta seca (DABROWSKI, 1984) e a garantia do desenvolvimento, crescimento e sobrevivência nessa fase é baseada praticamente na alimentação com organismos vivos (PERSON LE RUYET, 1989; BENGSTON, 1991).

Em contra partida, muitos estudos estão sendo dirigidos no sentido de se possibilitar a utilização das dietas secas no processo alimentar das larvas, visando a diminuição da alta dependência do alimento vivo nessa fase. Vários fatores têm sido relacionados às dificuldades que inviabilizam a aceitação satisfatória desse tipo de alimento, tanto em relação aos aspectos intrínsecos às larvas como aos inerentes às características físicas e nutricionais da dieta seca (DABROWSKI, 1984; FERNANDEZ-DÍAZ et al., 1994; WATANABE e KIRON, 1994; PLANAS e CUNHA, 1999; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001), ressaltando, inclusive, o desconhecimento das exigências nutricionais das larvas (WATANABE e KIRON, 1994).

Estudos sobre a assimilação dos nutrientes por larvas de peixes têm sido limitados por vários fatores, entre eles a impossibilidade de se aplicar o uso de técnicas indiretas como a coleta fecal (SCHLECHTRIEM et al., 2004), método comumente empregado em estudos de nutrição com juvenis para a avaliação da digestibilidade das dietas e ingredientes.

Uma das possibilidades que permite avaliar o metabolismo e a assimilação dos nutrientes dos alimentos no tecido animal é a técnica dos radioisótopos (SCHROEDER, 1983). Mas o uso de substratos ou alimentos marcados com isótopos radioativos está sujeito a muitos regulamentos e restrições de segurança invariavelmente, é confinado a um pequeno sistema em condições laboratoriais controladas e pode oferecer riscos à saúde e

possibilidade de contaminação ambiental (SCHROEDER, 1983; TYRRELL et al., 1984; PRESTON et al., 1996; OWEN et al., 1999). O necessário seria um conjunto de traçadores ocorrendo naturalmente permitindo rastrear o metabolismo dos constituintes alimentares, condição que pode ser obtida através dos isótopos estáveis (i.e. $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^2\text{H}$; $\delta^{15}\text{N}$) que variam caracteristicamente entre os tecidos das plantas e algas (SCHROEDER, 1983). O autor refere-se aos isótopos estáveis como traçadores onipresentes que ocorrem naturalmente, oferecendo, por isso, uma grande quantidade de substratos "marcados" prontamente disponíveis para serem utilizados.

As variações isotópicas têm sido amplamente exploradas, há muitos anos, por cientistas nas áreas da fisiologia vegetal, geoquímica e paleontologia, sendo posteriormente adotadas por ecologistas, em escala crescente, nos estudos sobre os processos e fluxos energéticos dos ecossistemas terrestres e aquáticos (GANNES et al., 1998).

Os elementos químicos carbono, nitrogênio, enxofre, hidrogênio e oxigênio possuem mais de um isótopo estável e a composição isotópica dos materiais pode ser mensurada com precisão pelo espectrômetro de massa (PETERSON e FRY, 1987). Na natureza, os elementos estáveis ocorrem em diferentes concentrações, i.e. dois isótopos estáveis de carbono, carbono-12 e carbono-13, ocorrem em abundâncias naturais aproximadamente de 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (O'LEARY, 1988). Durante os processos de fotossíntese, as plantas discriminam o carbono do CO_2 assimilado em favor do isótopo mais leve, o ^{12}C (BENDER, 1971; O'LEARY, 1988) e, em função do ciclo fotossintético que realizam, plantas C_3 ou C_4 apresentam um fracionamento isotópico distinto gerando diferenças médias de 12 a 14‰ entre os dois grupos de plantas (BENDER, 1971). Essa variação isotópica entre os grupos fotossintéticos C_3 e C_4 oferece a possibilidade de rastrear o carbono da fonte alimentar que o animal utilizou (TYRRELL et al., 1984). O emprego dos isótopos estáveis de carbono na identificação das fontes alimentares a partir dos consumidores tem sido baseado nas observações de que o conteúdo de ^{13}C do animal reflete o valor de $\delta^{13}\text{C}$ da respectiva dieta, devido ao pequeno fracionamento associado aos processos de respiração e incorporação do carbono pelo animal (DENIRO e EPSTEIN,

1978; CRÉACH et al., 1997), fazendo com que $\delta^{13}\text{C}$ do produtor primário seja uma marca transferível para os consumidores subseqüentes (PARKER et al., 1989).

Embora as plantas não fracionem o nitrogênio nas vias biosintéticas, existe uma variação na composição da fonte de nitrogênio que induz as plantas a terem sinais isotópicos distintos (GANNES et al., 1998). Os isótopos estáveis de nitrogênio, além de serem utilizados também para determinar a alimentação, têm sido aplicados na avaliação das relações tróficas da cadeia alimentar, devido ao consistente e significativo enriquecimento do ^{15}N entre o animal e a dieta (CRÉACH et al., 1997; PETERSON e FRY, 1987).

A variação na abundância natural dos isótopos estáveis tem sido uma ferramenta de grande potencial e com ampla aplicação em várias ciências (GANNES et al., 1998; GU, 1994). Nos diversos estudos relacionados aos sistemas aquáticos, naturais ou artificiais, o uso dos isótopos estáveis tem atingido resultados satisfatórios dentro dos objetivos propostos, sejam para fins da ecologia ou da aquicultura (TIESZEN et al., 1983; FRY e ARNOLD, 1982; PARKER et al., 1989; KLING e FRY, 1992; HESSLEIN et al., 1993; LOCHMANN e PHILLIPS, 1996; DITTEL et al., 1997; FURUYA et al., 2002; MANETTA e BENEDITO-CECÍLIO, 2003; ZUANON, 2003; DEMPSON e POWER, 2004; SCHLECHTRIEM et al., 2004). A aplicação dos isótopos estáveis em estudos que visam determinar a assimilação dos nutrientes dos alimentos que tenham sinais isotópicos distintos, traz a vantagem de registrar apenas a contribuição dos alimentos que foram realmente metabolizados e assimilados pelo animal (SCHROEDER, 1983; ROUNICK e HICKS, 1985; PARKER et al., 1989) e permite uma avaliação mais sensível do aproveitamento das dietas.

O teleósteo pacu *Piaractus mesopotamicus*, uma das espécies mais estudadas e criadas no Brasil, é de grande importância para a aquicultura por se adaptar ao cultivo intensivo e ser bastante apreciada pelo mercado consumidor, não só no Brasil, mas em outros países da América do Sul onde também é nativa; o aumento de informações sobre essa espécie também contribui tecnicamente com informações que podem ser aproveitadas

para outras espécies correlatas, (i.g. *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachipomus*) comercialmente criadas em outros países da América do Sul e da América Central.

Assim como em muitas das espécies de peixes, a larvicultura do pacu é uma etapa que requer cuidados mais intensos, principalmente no que se refere à alimentação. Trabalhos com larvas da espécie têm mostrado a dependência do fornecimento do alimento vivo nos primeiros dias da alimentação exógena (JOMORI, 1999; MACEDO-VIEGAS et al., 2003; TESSER et al., 2005). Estudos recentes com larvas da espécie (Jomori et al., 2005 em preparação - Artigo 2 da presente Tese) mostraram a possibilidade de realizar a substituição total do alimento vivo a partir de 12 dias do início da alimentação exógena, sem que fossem prejudicados o crescimento e sobrevivência das larvas.

Estudos sobre a assimilação e retenção dos nutrientes dos alimentos, vivo e seco, no tecido larval contribuiriam para a elucidação dos processos de alimentação e nutrição das larvas, permitindo nortear melhor a elaboração das dietas secas e embasando o planejamento de estratégias alimentares mais eficientes visando o uso racional de ambos os alimentos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi utilizar a técnica dos isótopos estáveis no estudo da substituição do alimento vivo, identificando o momento em que as larvas de pacu começam a apresentar sinais da dieta seca em seus tecidos corporais através da assimilação dos átomos de carbono e nitrogênio desse alimento, denotando a ocorrência do aproveitamento da dieta seca pelas larvas. Para tal, propôs-se a determinação do enriquecimento relativo do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) dos alimentos vivo e seco, e do tecido de larvas de pacu alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* ou dieta seca, com a mistura de ambos e em processo de substituição do alimento vivo, em diferentes tempos.

Como existem várias denominações para os animais durante o período que compreende o início da alimentação exógena até formação do juvenil, o termo larva utilizado no presente estudo considera a caracterização de Kendall et al. (1984) definindo, basicamente, dois estágios: larval e juvenil, quando os animais já apresentam as características dos adultos.

2. Material e Métodos

Análises isotópicas preliminares

Para viabilizar o fornecimento conjunto dos alimentos, vivo e seco, primeiramente foram certificados os alimentos potenciais que poderiam ser utilizados levando em consideração a necessidade de serem isotopicamente diferentes. Dessa forma, antes de realizar o experimento, avaliações preliminares foram efetuadas para determinar os sinais isotópicos dos alimentos: náuplios de *Artemia* de duas origens (Great Salt Lakes, EUA, e da região de Grossos, RN, Brasil) e da dieta seca comercial FryFeed Kyowa B, Japão. A escolha da dieta seca foi baseada em resultados de desempenho anteriormente obtidos com as larvas de pacu com esse alimento (JOMORI et al., 2005 – Capítulo II da presente Tese).

Os resultados dos enriquecimentos isotópicos dos alimentos (Tabela 1) revelaram diferentes valores dos náuplios de *Artemia* em função da sua origem, tanto pela análise do carbono como do nitrogênio. Os valores isotópicos dos náuplios de *Artemia* dos cistos oriundos dos "Great Salt Lakes" mostraram-se mais próximos aos da dieta seca, principalmente em relação ao carbono. Dessa forma, foram utilizados no experimento seriam os náuplios de *Artemia* oriundos dos cistos coletados na região Nordeste do país e a dieta FryFeed Kyowa B, para que houvesse diferença isotópica entre os alimentos.

Com base nessas informações, os alimentos foram adquiridos (cinco lotes de cistos de *Artemia* e quatro lotes de dieta seca) e novamente analisados para confirmar as diferenças isotópicas anteriormente obtidas. No caso da *Artemia* foram analisadas amostras de cistos e náuplios em diferentes idades, com 24 e 40 horas após a incubação dos cistos.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos enriquecimentos isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do alimento vivo e da dieta seca.

Amostras	Carbono ($\delta \text{‰ } ^{13}\text{C}$)	Nitrogênio ($\delta \text{‰ } ^{15}\text{N}$)
Dieta Fry feed Kyowa B	-24,2 ± 0,0	8,5 ± 0,2
<i>Artemia</i> (Nordeste – Brasil)	-15,5 ± 0,0	4,9 ± 0,0
<i>Artemia</i> (Great Salt Lake – EUA)	-22,2 ± 0,1	12,6 ± 0,0
Dieta seca comercial *		
Lote "I"	-25,1 ± 0,0	7,4 ± 0,0
Lote "II"	-24,9 ± 0,0	7,4 ± 0,0
Lote "III"	-25,2 ± 0,0	7,2 ± 0,0
Lote "IV"	-25,0 ± 0,0	7,7 ± 0,0
Náuplios de <i>Artemia</i> (24 horas após incubação dos cistos) *		
Lote "1"	-16,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1
Lote "2"	-15,3 ± 0,0	4,8 ± 0,1
Lote "3"	-16,9 ± 0,0	6,8 ± 0,0
Lote "4"	-16,8 ± 0,0	7,0 ± 0,0
Lote "5"	-17,1 ± 0,0	7,0 ± 0,0

* Alimentos adquiridos para a realização da pesquisa: lotes da dieta seca comercial (Fry feed Kyowa B, Japão) e lotes de cistos de *Artemia* originários da região nordeste do Brasil (Bio-Artemia).

Entre as amostras da dieta seca, todos os lotes apresentaram valores isotópicos próximos, com médias de $-25,0 \pm 0,1\text{‰}$ para o carbono e $7,4 \pm 0,2\text{‰}$ para o nitrogênio (Tabela 1). Os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de náuplios mostraram-se distintos entre os diferentes lotes, mesmo os cistos sendo originários de uma mesma região. As variações verificadas entre essas amostras foram de $-15,3$ a $-17,1\text{‰}$ para o carbono e $4,8$ a $7,7\text{‰}$ para o nitrogênio. Assim, todos os lotes da dieta seca mostraram-se disponíveis

para o uso, enquanto que apenas um do alimento vivo (lote 2) se diferenciou da dieta seca tanto em nitrogênio como em carbono ao mesmo tempo.

Em relação às amostras de náuplios com 24 e 40 horas após a incubação, os maiores valores de desvio padrão foram de 0,5‰ para o carbono (verificado entre as amostras do lote 4) e de 0,2‰ para o nitrogênio (lote 5). Já comparando cistos e náuplios, os maiores valores para o desvio padrão foram de 1,3‰ para o carbono e 0,4 ‰ para o nitrogênio (lote 3).

Condições experimentais gerais e instalações

Com base nos resultados isotópicos preliminares foram utilizados no experimento os náuplios de *Artemia* oriundos dos cistos coletados na região Nordeste do país (lote "2") e a dieta comercial FryFeed Kyowa B (Japão) como substituto total ou parcial do alimento vivo. Os tratamentos alimentares foram delineados com base nos resultados de estudos anteriores para larvas da espécie visando a substituição do alimento vivo (JOMORI, 1999; TESSER et al., 2005; JOMORI et al., 2005 – capítulo II da presente Tese):

A – Alimento vivo por todo período experimental;

JJ - Larvas mantidas em jejum desde o início;

D – Dieta seca por todo período;

A +D – Alimento vivo e dieta seca durante todo o período experimental;

A 3 D - Alimento vivo por 3 dias, seguido somente da dieta seca no período subsequente;

A 6 D - Alimento vivo por 6 dias, seguido somente da dieta seca no período subsequente;

A12 D - Alimento vivo e dieta seca por 12 dias, seguido somente da dieta seca no período subsequente

Foram utilizadas cerca de 67.000 larvas de pacu com cinco dias de vida, apresentando valores médios de comprimento total e peso de $5,3 \pm 0,2$ mm e $0,43 \pm 0,05$ mg, respectivamente. A quantidade de larvas para os tratamentos foi estimada levando em

consideração a sobrevivência esperada, as coletas para as avaliações biométricas e, principalmente, o número total de larvas que seriam retiradas para a análise dos isótopos ao longo do experimento. O número de larvas coletadas para esse fim variou longo ao do tempo conforme o crescimento dos animais, de modo que fosse possível a obtenção de um "pool" de larvas em quantidade suficiente para fornecer cerca de 250 mg de peso seco.

Desta maneira, em todos os tratamentos em que as larvas inicialmente iriam receber alimento vivo foram destinadas 8.000 larvas por tratamento, distribuídas em quatro tanques de polietileno contendo 100 litros de água cada. No tratamento com a dieta seca por todo o período (D), prevendo uma alta ou total mortalidade e uma baixa taxa de crescimento, a quantidade de larvas foi superior, no total 16.000 larvas, distribuídas em oito tanques. Para estes tratamentos citados acima, as larvas foram contadas individualmente. Já no tratamento de jejum, a quantidade de larvas foi estimada em cerca de 24.000 animais, prevendo que a possibilidade de coleta seria até cerca de 12 dias após início do experimento (fundamentado em resultados prévios).

A água utilizada para abastecer os tanques provinha de poço artesiano (garantindo a ausência de organismos planctônicos na água), e os tanques foram mantidos em fluxo de água contínuo e aeração artificial constante. Os parâmetros limnológicos apresentaram valores médios de $5,85 \pm 0,40$ mg/L para oxigênio dissolvido; $183 \pm 1,5$ μ S/cm para a condutividade; $8,0 \pm 0,5$, para o pH e $30 \pm 0,5$ °C para a temperatura, com o uso de aquecedores. Os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram removidos diariamente, por sifonamento. O experimento teve duração de 42 dias.

Manejo alimentar

Nos tratamentos A3 D e A6 D, a substituição do alimento vivo foi abrupta, sem fase de alimentação conjunta. No tratamento A12D, seis dias antes da supressão total do alimento vivo, o número de náuplios de *Artemia* oferecido foi diminuído em 25 e 50 %, a cada três dias. A oferta de náuplios ocorreu conjuntamente à de dieta seca. Os alimentos vivo e seco foram oferecidos na frequência de quatro e seis vezes ao dia, respectivamente.

O alimento vivo foi fornecido nas quantidades de 100 náuplios.larva⁻¹ até o terceiro dia e 250 náuplios.larva⁻¹ até o sexto dia. A partir desse período até o 33º dia de experimento, as quantidades foram acrescidas de 250 náuplios por larva a cada três dias e, a partir do 34º dia até o final, as quantidades aumentaram em 500 náuplios.larva⁻¹, também a cada três dias.

Algumas medidas foram padronizadas no manejo diário do alimento vivo, tais como: a retirada (máxima possível) das cascas e cistos não eclodidos do concentrado de náuplios fornecido às larvas e a produção de náuplios recém-eclodidos duas vezes ao dia (pela manhã e a tarde).

Durante a condução do experimento, amostras de náuplios (n=5 do lote 2) foram novamente coletadas em dias aleatórios, para confirmação do sinal isotópico deste alimento, já que a produção dos náuplios era um procedimento realizado diariamente. Observou-se que os valores isotópicos dos náuplios praticamente mantiveram-se os mesmos, apresentando valores médios de $-15,0 \pm 0,2\%$ para $\delta^{13}\text{C}$ e $4,6 \pm 0,2\%$ para o $\delta^{15}\text{N}$. Esses valores foram próximos àqueles obtidos nas análises preliminares (Tabela 1).

Avaliação do crescimento e sobrevivência dos animais

Para o acompanhamento do crescimento foram coletadas 45 larvas de cada réplica experimental. As coletas eram realizadas simultaneamente às destinadas à análise dos isótopos. No final do experimento também foram determinadas as taxas de sobrevivência das larvas em cada réplica experimental. A determinação do comprimento das larvas foi através de paquímetro digital e, para as larvas menores que 10 mm, a medida foi realizada sob microscópio estereoscópico. O peso dos animais foi obtido em balança analítica.

Análises Estatísticas

Os resultados de peso, comprimento total e sobrevivência foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância Paramétrica (ANOVA), pelo teste F de

Fischer-Snedecor (ZAR, 1998), considerando-se os resultados médios das réplicas de cada parcela experimental. Nos resultados que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$), as médias foram estudadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todas as variáveis biométricas foram avaliadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Bartlett). Os dados de sobrevivência foram transformados em $y = \arcsin \sqrt{x/100}$, sendo x representa o valor da porcentagem de sobrevivência. Todas as análises e transformações foram analisadas através de programa SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, v.8).

Na análise referente aos dados coletados aos três dias de alimentação, as médias de comprimento e peso obtidos nos esquemas A3D, A6D e A foram consideradas estatisticamente como um mesmo tratamento, pois estavam nas mesmas condições alimentares; assim como os esquemas A12D e A+D nesse mesmo período. Na estatística referente aos seis dias de alimentação, o mesmo foi considerado para as médias dos esquemas A6D e A, assim como para as médias dos esquemas A12D e A+D.

Análise do enriquecimento relativo do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)

Antes de proceder às análises isotópicas realizou-se o seguinte protocolo:

- ***Coleta***

As amostras de larvas foram coletadas no início e a cada três dias, até o 12º dia de experimento. A partir daí, as amostras foram tomadas a cada seis dias. Devido ao pequeno tamanho das larvas a amostra foi formada por um "pool" de animais. A quantidade total de larvas estimada para a coleta era dividida entre as réplicas dos tratamentos, formando-se um único "pool" de larvas em cada tratamento. Os animais eram coletados sempre antes da primeira refeição do dia e acondicionados em recipientes contendo água limpa (sem fezes ou resíduos alimentares) e aerada artificialmente. Nesses recipientes, os animais foram mantidos em jejum por um tempo que variou, de 12 a 24 horas, para cada período analisado (devido o tamanho dos animais ao longo do tempo). Esse procedimento teve por finalidade

permitir o esvaziamento do tubo digestivo dos animais e evitar contaminação através do conteúdo alimentar, o qual pode alterar o sinal isotópico. A presença dos resíduos alimentares no tubo digestivo foi acompanhada por transparência do animal (até quando possível), sob lupa. Após o período do jejum, as larvas foram sacrificadas em gelo, enxaguadas com água destilada e acondicionadas em freezer.

- ***Preparo dos animais para a análise isotópica***

O preparo dos animais preservados para as análises isotópicas foi constituído por várias etapas:

- 1) Determinação do comprimento, peso e separação dos animais por tamanho

Primeiramente, as larvas foram medidas e pesadas e, a partir da coleta realizada aos 18 dias de experimento, foram classificadas por tamanho. Essa separação passou ser realizada em função da heterogeneidade existente entre os animais, que ficou cada vez mais evidente com o crescimento dos peixes ao longo do experimento. Desta maneira, procurou-se fazer a análise isotópica com animais separados em diferentes classes de tamanho, para evitar que essa variável interferisse na análise dos resultados, já que a heterogeneidade existia tanto entre os animais do mesmo tratamento como entre os tratamentos. As classes de tamanho com base no comprimento total foram: < 12mm; 12,1 a 15mm; 15,1 a 18mm; 18,1 a 24mm; 24,1 a 30mm; maior que 30,1 mm (Anexo 1).

- 2) Avaliação da presença de alimento no tubo digestivo, dissecação das larvas (evisceração) e separação do animal em duas frações: cabeça e restante do corpo

Nas coletas iniciais (até 12 dias), as amostras eram formadas por animais inteiros, devido ao pequeno tamanho das larvas, e à dificuldade de manuseio pela fragilidade do tecido larval. As larvas que ainda continham alimento no tubo digestivo eram eliminadas do "pool" amostral. Nas coletas posteriores (a partir de 18 dias), constatou-se que muitos animais ainda apresentavam resíduos alimentares no tubo digestivo. Dessa forma, todos os animais destinados à análise dos isótopos tiveram o trato digestório removido (sob lupa).



Esse cuidado foi necessário, pois o alimento presente no tubo digestivo da larva refletiria o sinal isotópico do próprio alimento e não o que realmente a larva teria assimilado e incorporado em seus tecidos (Anexo 2).

As larvas de tamanho superior a 10 mm de comprimento total (i.e. coletas realizadas após 12 dias) foram analisadas em duas frações separadamente: cabeça e corpo, tendo em vista que animais mais avançados apresentam um acúmulo de massa corporal mais expressivo e passam por uma série de mudanças e transformações "morfo-fisiológicas" (i.e. processo de ossificação, desenvolvimento da musculatura, formação das nadadeiras, desenvolvimento dos órgãos, etc.) que as tornam muito diferentes dos animais em início de desenvolvimento (Anexo 1).

Após a dissecação, as larvas eram enxaguadas em água destilada e colocadas em placa de Petri para a secagem em estufa, com ventilação forçada regulada em 60° C, até a obtenção de peso constante.

3) Moagem dos animais secos e pesagem das amostras

O material seco, livre de impurezas e contaminantes, foi finamente moído em moinho criogênico a base de nitrogênio líquido (-196°C). Algumas amostras tiveram que ser moídas em almofariz com pistilo, devido à pequena quantidade de material seco. Posteriormente, uma alíquota de amostra (~500µg), em duplicata para cada isótopo estável a ser analisado, era colocada em cápsulas de estanho para as análises no espectrômetro de massa.

Em todas as etapas desses procedimentos, o uso de luvas cirúrgicas descartáveis para manipular as amostras, o cuidado com a lavagem das mãos e dos materiais (pinças, bisturis, almofariz e pistilo, tubos utilizados no moinho criogênico, etc.) entre a manipulação de uma amostra e outra foram práticas indispensáveis para evitar contaminações.

Análises isotópicas do carbono e nitrogênio no tecido larval

Para a determinação da composição isotópica dos alimentos e tecido larval, as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ das amostras foram mensuradas comparativamente com a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do padrão internacional PDB (Fóssil *Belemnitella americana* da formação cretácea Pee Dee do Sul da Carolina/USA) e com a razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do padrão internacional Nitrogênio Atmosférico, respectivamente. A comparação relativa entre a amostra e o padrão expressa-se, na terminologia isotópica, como enriquecimento relativo ou delta per mil, mensurada pela expressão (1):

$$\delta\text{‰}^{13}\text{C} \text{ ou } \delta\text{‰}^{15}\text{N} = [(R \text{ amostra} / R \text{ padrão}) - 1] \times 10^3, \quad (1)$$

na qual, R é a razão isotópica, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, da amostra e do padrão, respectivamente, e $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}$ é o enriquecimento isotópico (delta per mil) da amostra relativo ao padrão PDB ou nitrogênio atmosférico, respectivamente (Ducatti et al., 1982).

As cápsulas de estanho contendo as amostras foram introduzidas no analisador elemental, acoplado no espectrômetro de massa (IRMS/EA) para as análises individuais de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, com erro analítico da ordem de 0,2‰. As análises foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências/ UNESP, Campus de Botucatu, SP.

Com os valores dos enriquecimentos isotópicos foi traçado o perfil isotópico das larvas ao longo do tempo e averiguado os sinais da presença da dieta seca no tecido larval. Nos tratamentos, em que os animais receberam somente o alimento vivo (Larvas A) ou a dieta seca (Larvas D), a incorporação dos átomos de carbono e de nitrogênio dos alimentos no tecido larval, em função do tempo, foi mensurada usando o modelo exponencial descrito por Ducatti et al. (2002):

$$y_{(t)} = (q/k) + [y_0 - (q/k)] e^{-kt} \quad (2)$$

Na expressão (2), as simbologias empregadas significam:

$y_{(t)} = \delta\text{‰}^{13}\text{C}_{(t)}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}_{(t)}$ = enriquecimento isotópico do carbono ou nitrogênio no tecido em qualquer tempo t, expresso em ‰; adimensional;

$y_0 = \delta\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{inicial}}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}_{\text{inicial}}$ = enriquecimento isotópico do carbono ou nitrogênio inicial no tecido, em ‰ (no presente estudo esse valor é representado pelo valor isotópico da larva inicial, antes da introdução do alimento vivo ou seco), adimensional;

$q/k = \delta\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{final}}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}_{\text{final}}$ = enriquecimento isotópico do carbono ou nitrogênio no tecido larval ao atingir o patamar de equilíbrio, em ‰ (valor assintótico), adimensional;

k = taxa de substituição e incorporação de carbono ou nitrogênio no tecido, em unidades de tempo⁻¹;

t = tempo, em dias.

O modelo matemático, proposto originalmente para avaliar a substituição do carbono tecidual em animal adulto, tem sido aplicado também para animais em fase de crescimento, e revelado um bom ajuste aos dados observados (FURUYA et al., 2002; ZUANON, 2003). Zuanon (2003), que testou a aplicabilidade desse modelo teórico em juvenis de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, considerou o modelo adequado para animais em crescimento, uma vez que a constante (k) de diluição isotópica do modelo proposto integra o efeito da adição de tecido novo (crescimento) e do *turnover* (substituição metabólica).

Com base no valor da constante k , a meia-vida do carbono e do nitrogênio no tecido larval, que expressa a condição de 50% de cada fonte isotópica no tecido, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula descrita por Ducatti et al. (2002): $T = \ln 2/k$, onde:

T = meia-vida em dias;

\ln = logaritmo neperiano;

k = taxa de substituição de carbono ou nitrogênio no tecido em unidades de tempo⁻¹.

Para o ajuste dos dados observados ao modelo exponencial, os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ larval foram analisados por meio do software Origin® 6.0 Professional (MICROCAL SOFTWARE, 1999).

3. Resultados e Discussão

Avaliação do crescimento e sobrevivência dos animais

Os resultados das análises estatísticas pelo teste F, referentes aos valores médios de comprimento total e peso, mostraram efeitos altamente significativos ($P < 0,01$) para os tratamentos, em todos os períodos analisados. Dessa forma, as médias comparadas pelo teste de Tukey (Tabelas 2 e 3) mostraram que, já a partir do terceiro dia de experimento, as larvas do tratamento jejum e aquelas que receberam somente dieta seca (D) apresentaram as menores médias de crescimento ($P < 0,05$) e não diferiram entre si. As médias dos demais tratamentos foram superiores e semelhantes ($P > 0,05$), pois até esse momento todas as larvas estavam recebendo as mesmas quantidades de alimento vivo, ainda que, nos tratamentos A+D e A12D, a dieta seca também já fizesse parte da alimentação diária das larvas.

Diferenças estatísticas entre as larvas em jejum e aquelas alimentadas somente com dieta seca (D) só foram evidenciadas na avaliação realizada aos nove dias, principalmente em relação ao peso quando foi verificado ligeiro aumento de peso nas larvas do tratamento D e uma diminuição nas do tratamento jejum.

A supressão precoce do alimento vivo, esquemas A3D e A6D, logo mostrou o seu efeito sobre o crescimento dos animais, pois na avaliação biométrica imediatamente seguinte, aos seis e nove dias de alimentação, respectivamente, as larvas apresentaram menores valores médios ($P < 0,05$), que aquelas que continuaram recebendo o alimento vivo. As larvas mantidas em jejum foram coletadas até nove dias, pois mortalidade total foi constatada no 11º dia de experimento.

De maneira geral, a partir de 12 dias, observou-se que as larvas dos tratamentos D, A3D e A6D continuaram apresentando os menores valores médios de comprimento e peso ($P < 0,05$). Porém, ainda que o crescimento dos animais tenha sido prejudicado pela retirada precoce ou total ausência do alimento vivo, a tendência observada ao longo do tempo foi de que a dieta seca assegurou algum crescimento dos animais desses tratamentos.

Tabela 2- Valores médios de comprimento total (mm) das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidas aos diferentes tratamentos alimentares.

Tratamentos	Dias após o início da alimentação exógena								
	3	6	9	12	18	24	30	36	42
A	6,2 ^a ±0,2	7,5 ^a ±0,2	8,9 ^a ±0,8	11,0 ^a ±1,2	13,6 ^a ±1,4	15,3 ^a ±0,8	17,5 ^{bc} ±0,5	20,9 ^b ±0,5	23,2 ^c ±1,2
A + D	6,2 ^a ±0,2	7,2 ^a ±0,1	8,9 ^a ±0,4	10,2 ^a ±0,4	13,1 ^a ±0,7	16,4 ^a ±0,4	19,2 ^{ab} ±0,6	30,2 ^a ±0,9	38,3 ^a ±1,2
A 12 D	6,2 ^a ±0,2	7,2 ^a ±0,1	8,4 ^{ab} ±0,2	9,7 ^a ±0,2	11,8 ^{ab} ±0,2	13,3 ^a ±0,5	20,9 ^a ±0,3	30,9 ^a ±1,1	38,8 ^a ±1,0
A 6 D	6,2 ^a ±0,2	7,5 ^a ±0,2	7,6 ^{bc} ±0,3	8,2 ^b ±0,2	10,2 ^b ±0,5	12,6 ^b ±0,1	16,5 ^c ±1,1	21,4 ^b ±1,3	31,5 ^b ±1,7
A 3 D	6,2 ^a ±0,2	6,2 ^b ±0,2	6,6 ^{cd} ±0,6	7,3 ^{bc} ±0,4	8,0 ^c ±0,5	10,7 ^c ±0,9	13,6 ^d ±0,2	20,6 ^b ±0,2	27,7 ^{bc} ±1,1
D	5,4 ^b ±0,1	5,6 ^c ±0,1	6,1 ^{de} ±0,4	6,6 ^c ±0,2	7,3 ^c ±0,3	8,3 ^d ±0,5	10,6 ^e ±1,3	15,3 ^c ±2,0	30,7 ^{bc} ±4,7
Jejum	5,2 ^b ±0,1	5,4 ^c ±0,1	5,3 ^e ±0,1	-	-	-	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra (na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). A: alimento vivo; D: dieta seca; A3D, A6D e A12D: alimento vivo por três, seis e 12 dias, respectivamente, seguidos somente por dieta seca.

A retirada total tardia do alimento vivo parece não ter afetado tão intensamente o crescimento dos animais (A12D) como ocorrera com a substituição mais precoce (A3D e A6D). Logo após a mudança do alimento (aos 18 dias) as larvas A12D até apresentaram um menor crescimento em relação às que continuaram recebendo alimento vivo. Mas, essa diferença foi desaparecendo, de tal forma que aos 30 dias, esses animais apresentaram as maiores médias de comprimento e peso ($P < 0,05$), semelhantes ($P > 0,05$) aos valores encontrados nos animais que receberam simultaneamente o alimento vivo e seco (A+D). O sucesso dessa prática está diretamente relacionado com a qualidade do alimento seco

fornecido, conforme verificado por Jomori et al. (2005 – Artigo 2 da presente Tese) que obtiveram diferentes respostas de crescimento de larvas de pacu quando testaram várias dietas secas como substituto do alimento vivo nessa mesma fase do crescimento.

Tabela 3 - Valores médios de peso (mg) das larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidas aos diferentes tratamentos alimentares.

Tratamentos	Peso (mg)								
	Dias após o início da alimentação exógena								
	3	6	9	12	18	24	30	36	42
A	0,9 ^a ±0,2	2,1 ^a ±0,2	4,5 ^a ±0,2	10,0 ^a ±1,3	21,0 ^a ±4,2	43,7 ^a ±3,1	51,5 ^b ±4,0	136,41 ^{bc} 5,6±	203,2 ^c ±2,0
A + D	0,9 ^a ±0,2	2,1 ^a ±0,3	4,5 ^a ±0,2	9,8 ^a ±0,2	20,4 ^a ±6,2	44,9 ^a ±2,6	90,3 ^a ±8,9	438,1 ^a ±16,5	956,4 ^a ±108,9
A 12 D	0,9 ^a ±0,2	2,1 ^a ±0,3	4,0 ^a 0,4±	9,6 ^a ±0,3	13,7 ^{ab} ±0,2	38,2 ^b ±3,6	96,5 ^a ±7,0	430,2 ^a ±12,5	952,8 ^a ±8,2,6
A 6 D	0,9 ^a ±0,2	2,1 ^a ±0,2	2,0 ^b ±0,1	3,6 ^b ±0,6	11,0 ^{bc} ±0,8	16,4 ^c ±2,04	35,6 ^{bc} ±11,0	149,0 ^b ±13,3	465,1 ^b ±47,5
A 3 D	0,9 ^a ±0,2	1,1 ^b ±0,2	1,8 ^b ±0,2	2,1 ^c ±0,4	5,1 ^c ±1,2	10,4 ^{cd} ±0,4	29,6 ^c ±0,6	115,1 ^c ±13,7	306,3 ^{bc} ±18,6
D	0,4 ^b ±0,2	0,4 ^c ±0,1	0,9 ^c ±0,1	1,5 ^c ±0,1	2,9 ^c ±1,0	6,9 ^d ±1,2	10,3 ^d ±0,5	39,7 ^d ±0,6	280,2 ^c ±74,1
Jejum	0,3 ^b ±0,5	0,2 ^c ±0,6	0,2 ^d ±0,03	-	-	-	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra (na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).
A: alimento vivo; D: dieta seca; A3D, A6D e A12D: alimento vivo por três, seis e 12 dias, respectivamente, seguidos somente por dieta seca.

As maiores taxas sobrevivência ($P < 0,05$) foram verificadas nos tratamentos em que o alimento vivo foi fornecido por todo o período (A e A+D) ou quando a retirada deste alimento ocorreu tardiamente (A12D). Nos tratamentos D, A3D e A6D, as taxas de

sobrevivência obtidas foram insatisfatórias, sendo a menor obtida no tratamento D (Figura 1).

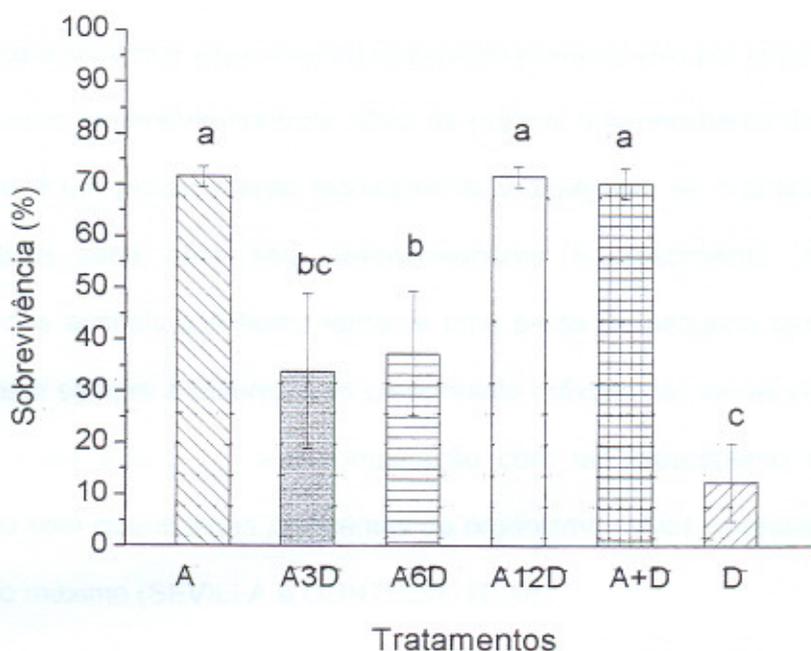


Figura 1. Valores médios das taxas de sobrevivência de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* ao final de 42 dias após o início da alimentação exógena. Larvas alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* (A) ou dieta seca (D); larvas em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três (A3D), seis (A6D) e 12 dias (A12D) após início da alimentação exógena e larvas alimentadas com náuplios + dieta seca por todo o período (A+D). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0.05$).

As larvas do tratamento A poderiam ter alcançado um crescimento maior nas etapas finais do experimento (dos 30 até 42 dias) se tivessem sido oferecidas quantidades maiores de náuplios de *Artemia*, pois, nesses períodos, praticamente não eram observadas sobras de náuplios. Porém, nessa etapa final do experimento, o nível de alimentação não pôde ser aumentado devido à reduzida quantidade de cistos disponível, uma vez que apenas um dos lotes de cistos adquiridos apresentava-se adequado ao estudo isotópico. Entretanto, tal evento não prejudicou os resultados do estudo, pois o enfoque principal era identificar o momento, em que a dieta seca passasse a ser um alimento também eficiente para as larvas, permitindo a retirada total do alimento vivo. Dentro do intervalo de tempo em que as

larvas começaram a buscar naturalmente a dieta seca, o alimento vivo estava sendo disponibilizado em excesso. As informações isotópicas dos animais do tratamento A também não foram prejudicadas.

Protocolo alimentar experimental que utilize alimento vivo por longo período pode ser necessário, como tratamento controle. Mas, na prática, o fornecimento de alimento vivo por longo período é um procedimento tecnicamente indesejável, se o animal já for capaz de aproveitar dieta seca para seu desenvolvimento e crescimento. Além disso, com crescimento dos animais a *Artemia* torna-se uma presa de pequeno tamanho (HAMRE et al., 2002) e nem sempre a obtenção do crescimento máximo das larvas com alimento vivo é a alternativa mais econômica em comparação com um crescimento menor, devido ao elevado gasto com quantidades crescentes de organismos vivos necessários para suportar o crescimento máximo (SEVILLA e GÜNTHER, 2000).

Análises isotópicas do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) do tecido larval

Larvas separadas em duas frações: cabeça e corpo

Os valores do $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ das duas frações mostraram algumas variações entre si, sendo maiores nos tratamentos A, A+D e A12D, que propiciaram maior crescimento aos animais. Em relação ao carbono-13 (Figura 2), as variações ocorridas nesses tratamentos foram da ordem de 0,4; 0,5 e 0,5‰, respectivamente. Para os isótopos de nitrogênio (Figura 3), as diferenças isotópicas entre as duas frações analisadas foram mais expressivas, alcançando valores de até: 1,7‰ (Larvas A); 0,7‰ (Larvas A3D); 0,5‰ (A6D); 1,7‰ (A12D); 1,4‰ (A+D) e 0,4‰ (Larvas D). Schmidt et al. (2004) sugere que a variabilidade entre os valores do $\delta^{15}\text{N}$ dos diferentes tecidos podem estar relacionada com o perfil de aminoácidos dos mesmos. Os autores encontraram variações em cerca de 1 a 2‰ entre os valores do $\delta^{15}\text{N}$ de krill *Euphausia superba* separados nas frações: região da glândula digestiva, segmento abdominal e a parte restante do corpo.

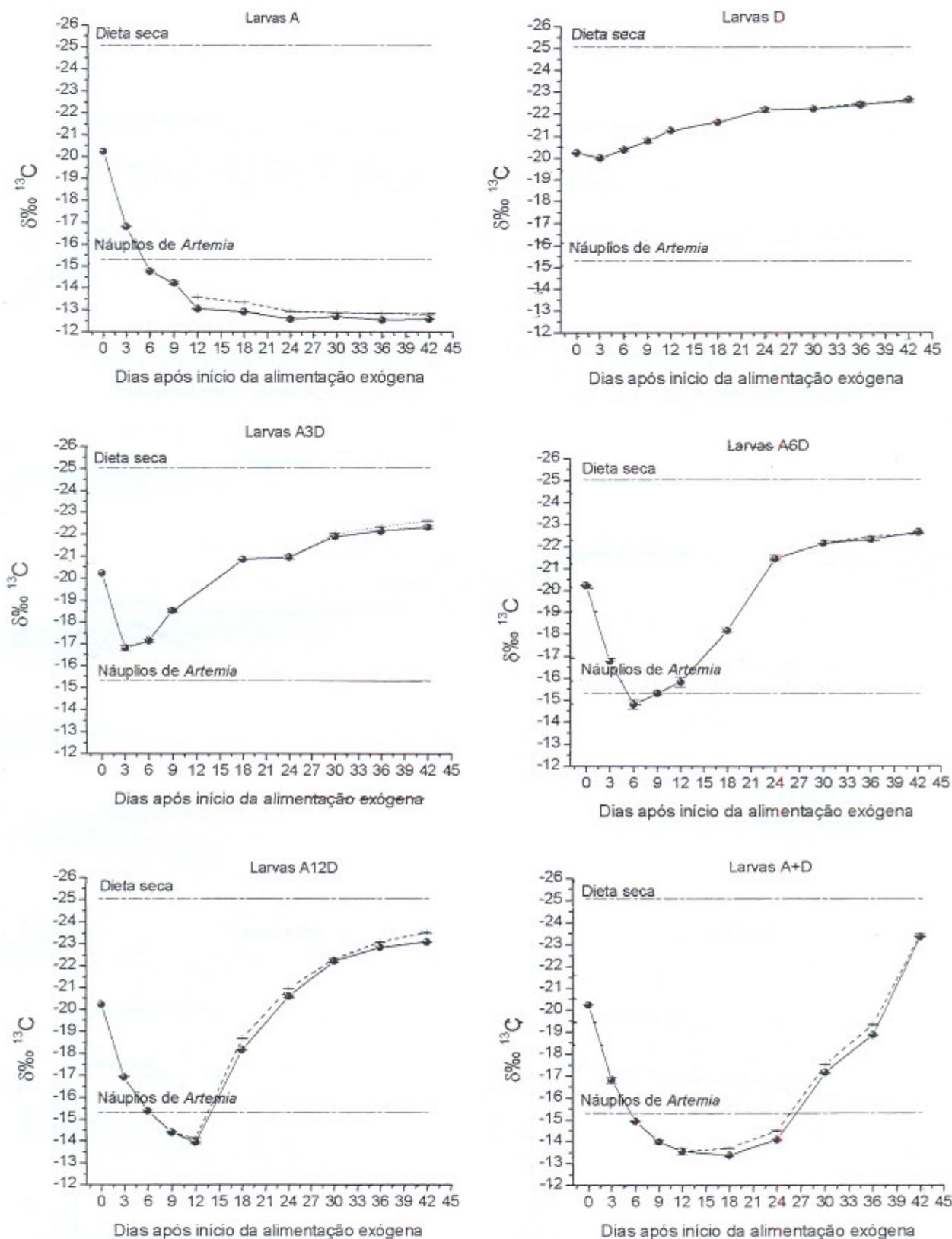


Figura 2. Valores do $\delta^{13}\text{C}$ de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* separadas em cabeça e parte restante do corpo. Larvas A e Larvas D: alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* ou dieta seca, respectivamente; Larvas A3D, Larvas A6D e Larvas A12D: em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três, seis e 12 dias após início da alimentação exógena, respectivamente; Larvas A+D: alimentação com náuplios + dieta seca por todo o período. Linha tracejada: cabeça; linha contínua: fração restante do corpo.

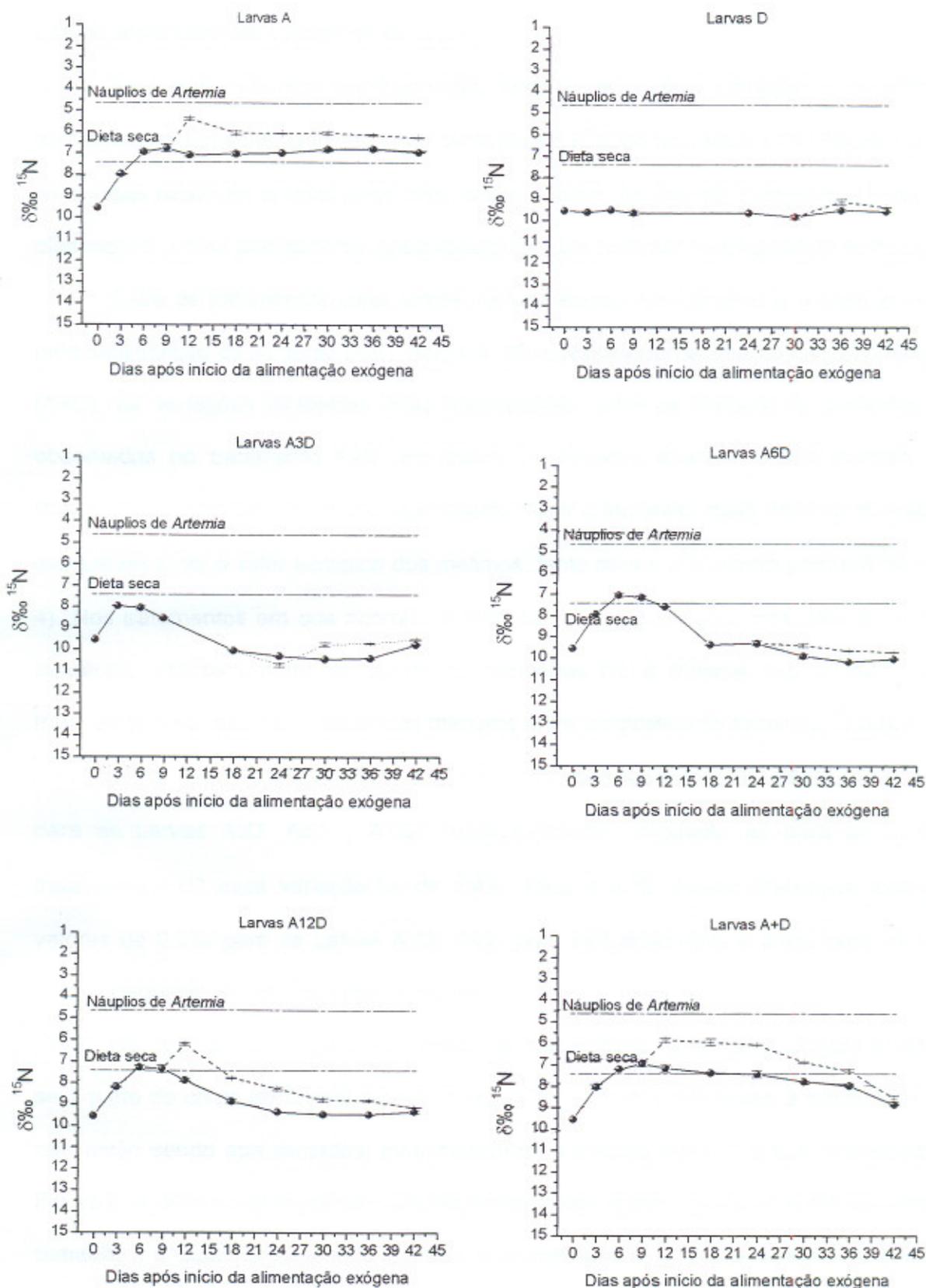


Figura 3. Valores do $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* separadas em cabeça e parte restante do corpo. Larvas A e Larvas D: alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* ou dieta seca, respectivamente; Larvas A3D, Larvas A6D e Larvas A12D: em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três, seis e 12 dias após início da alimentação exógena, respectivamente; Larvas A+D: alimentação com náuplios + dieta seca por todo o período. Linha tracejada: cabeça; linha contínua: fração restante do corpo.

Larvas separadas por classes de tamanho

Nas larvas que receberam somente náuplios, as maiores variações isotópicas entre as classes de tamanho foram de 0,6‰ tanto para o $\delta^{13}\text{C}$ como para o $\delta^{15}\text{N}$ (Figura 4). Como os animais recebiam apenas essa fonte desde o início, os valores isotópicos a partir de 24 dias mostraram-se praticamente já estabelecidos num patamar, independente do tamanho.

Entre os tratamentos cujas larvas tiveram acesso aos náuplios e à dieta seca, quer pela substituição do alimento (A3D, A6D e A12D) quer pelo fornecimento conjunto de ambos (A+D), as variações isotópicas mais discrepantes entre as classes de tamanho foram observadas no tratamento A+D, em todos os períodos analisados. Os animais desse tratamento mostraram claramente que quanto maior o tamanho, mais próximo do valor final das Larvas D foi o valor isotópico dos mesmos, tanto para o $\delta^{13}\text{C}$ como para o $\delta^{15}\text{N}$ (Figura 4). Nos tratamentos em que ocorrera a retirada dos náuplios após três, seis e 12 dias, a tendência isotópica entre os diferentes tamanhos foi a mesma que a verificada no tratamento A+D, mas com diferenças menores entre as classes de tamanho. Em relação ao $\delta^{15}\text{N}$, as maiores diferenças isotópicas entre os tamanhos foram de 0,9‰; 0,6‰ e 0,3‰ para as Larvas A3D, A6D e A12D, respectivamente, enquanto as para as larvas do tratamento A+D essa variação foi de 1,4‰. Para o $\delta^{13}\text{C}$, essas diferenças alcançaram valores de 0,3‰ para as Larvas A3D; 1,4‰ para as Larvas A6D e 0,9‰ para as Larvas A12D, chegando a 4,9‰ para as Larvas A+D.

Os valores isotópicos apresentados para as classes de tamanho (Figura 4) referem-se à parte do corpo do animal sem a cabeça. Os resultados referentes à fração da cabeça não estão sendo apresentados, mas mostraram a mesma tendência que a observada na Figura 4. A determinação da composição isotópica dos animais separados por categorias de tamanho, principalmente quando o animal teve acesso aos dois tipos de alimento por todo o período (Larvas A+D), mostrou ter sido uma abordagem metodológica pertinente para o entendimento das respostas isotópicas ao longo do tempo; caso contrário, os dados isotópicos poderiam ter gerado resultados confusos.

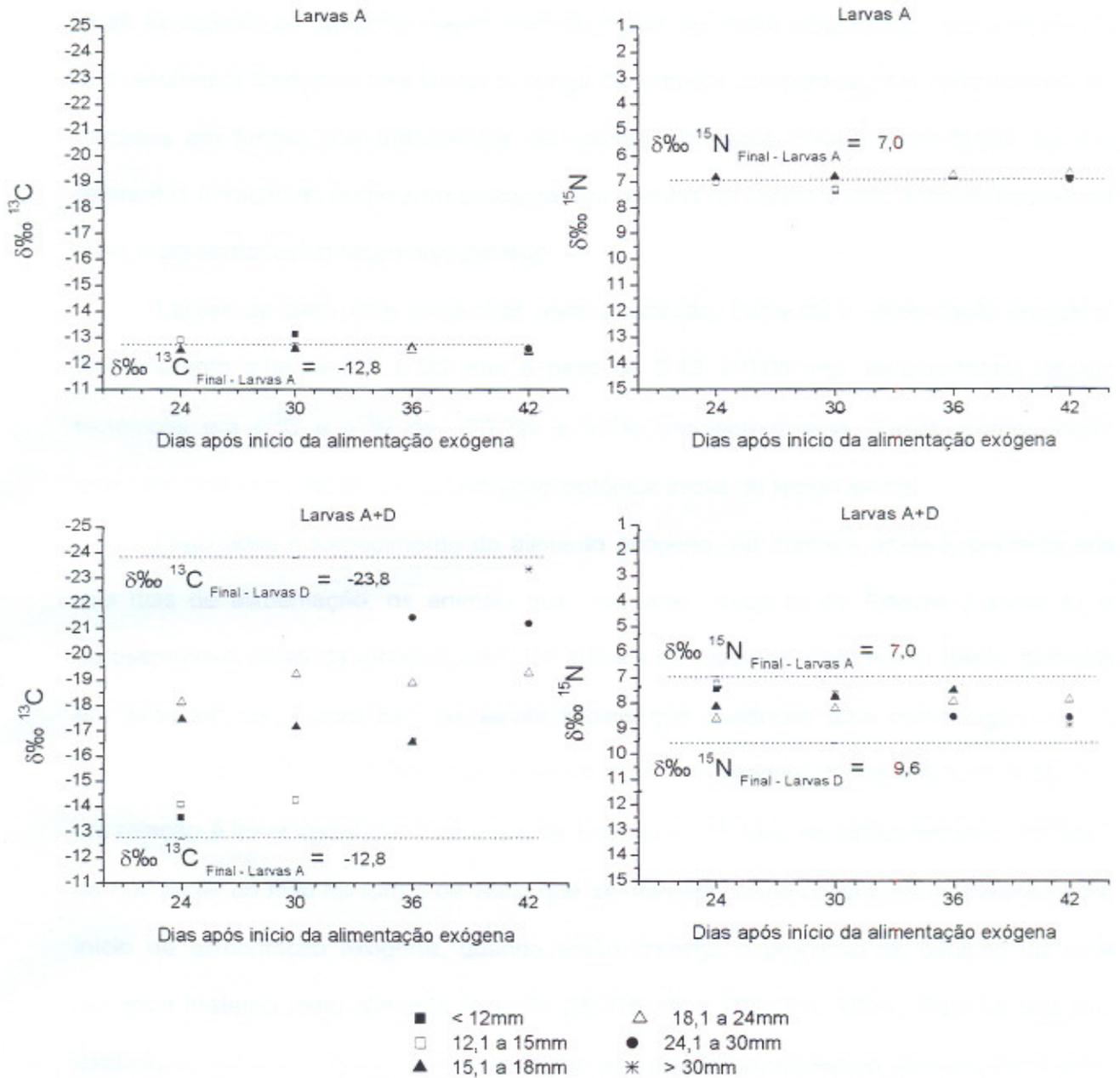


Figura 4. Valores do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* separadas por classes de tamanho. Larvas A: alimentação exclusiva com náuplios de *Artemia*; Larvas D: alimentação exclusiva com a dieta seca; Larvas A+D: alimentação com náuplios + dieta seca por todo período. Linhas tracejadas: para o $\delta^{13}\text{C}$ das Larvas A e Larvas D e $\delta^{15}\text{N}$ das Larvas A significam os valores estimados para o patamar do equilíbrio isotópico; para o $\delta^{15}\text{N}$ das Larvas D expressa o valor das Larvas D após 42 dias de alimentação.

Assim, considerando que houve diferenças entre as duas partes corpo do animal e entre as classes de tamanho, sejam elas de menor ou maior amplitudes, para a avaliação dos resultados isotópicos das larvas ao longo do tempo e comparação dos comportamentos traçados em função dos tratamentos, os valores isotópicos considerados foram aqueles referentes à fração do corpo sem a cabeça dos animais da classe de tamanho de frequência mais representativa no respectivo período.

Larvas de pacu com cinco dias após a eclosão, iniciando a alimentação exógena, (comprimento total de $5,3 \pm 0,2$ mm e peso de $0,43 \pm 0,05$ mg), apresentaram valores isotópicos em $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de $-20,2\text{‰}$ e $9,5\text{‰}$, respectivamente. Esses valores foram considerados como sendo a concentração isotópica inicial do tecido animal.

Logo após o fornecimento do alimento exógeno, na primeira análise realizada aos três dias de alimentação, os animais que receberam náuplios de *Artemia* (Larvas A) já apresentavam sinais da incorporação dos átomos de carbono e nitrogênio desse alimento em seus tecidos (Figura 5A). As larvas iniciais que possuíam uma composição de ^{13}C equivalente à $-20,2\text{‰}$, em três dias, apresentaram um enriquecimento em $3,4\text{‰}$ ($-16,8\text{‰}$) em relação à larva inicial ($\delta^{13}\text{C}$ náuplios de *Artemia* = $-15,1\text{‰}$). As larvas herdaram um "pool" de nutrientes da mãe na forma de vitelo que as mantém, como única fonte nutricional até o início da alimentação exógena, quando então começa o processo de diluição do sinal isotópico materno, pelo alimento ingerido (MURCHIR e POWER, 2004). Para os isótopos estáveis de nitrogênio uma mesma tendência em relação ao respectivo alimento consumido foi verificada (Figura 5B). Da larva inicial para a larva alimentada com náuplios, a composição isotópica mudou de $9,5\text{‰}$ para $8,0\text{‰}$ em três dias ($\delta^{15}\text{N}$ náuplios de *Artemia* = $4,7\text{‰}$). Ao longo do tempo, gradativamente, as mudanças na composição isotópica das Larvas A em relação à larva inicial continuaram, e o estabelecimento de um patamar com um valor mais rico em carbono-13 e nitrogênio-15 que do alimento foi verificado.

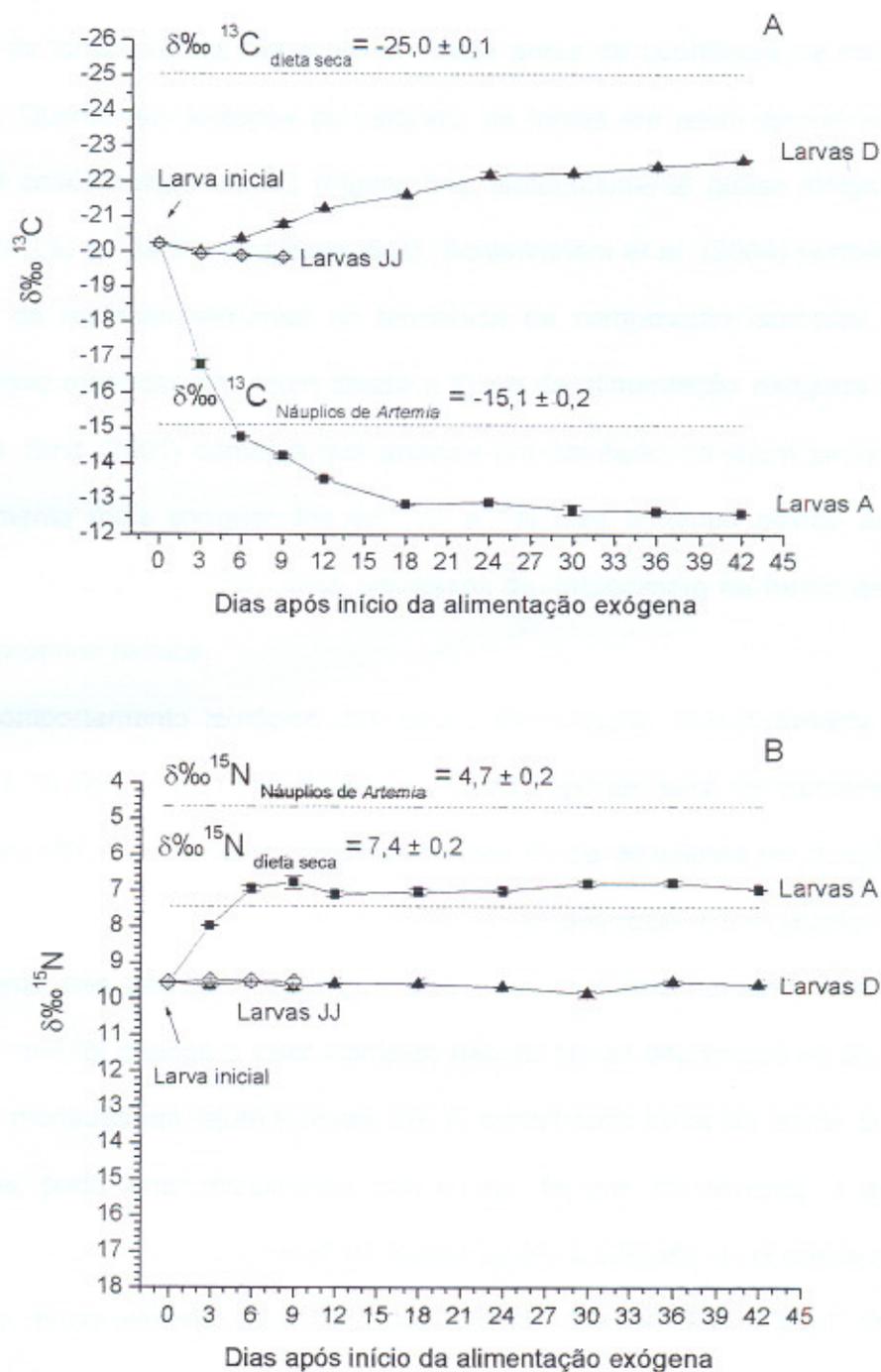


Figura 5. Valores do $\delta^{13}\text{C}$ (A) e $\delta^{15}\text{N}$ (B) de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* mantidas em jejum (Larvas JJ) e alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* (Larvas A) ou dieta seca (Larvas D).

As larvas mantidas em jejum apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ praticamente constantes em relação às larvas iniciais até a última coleta antes da ocorrência da mortalidade total (Figura 5B). Quanto aos isótopos de carbono, as larvas em jejum apresentaram um leve aumento na concentração do ^{13}C (Figura 5A), isotopicamente quase insignificante (valor inicial de $-20,2\text{‰}$ e $-19,9\text{‰}$ aos nove dias). Schleichriem et al. (2004) também verificaram esse efeito da restrição alimentar na tendência da composição isotópica de larvas de *Cyprinus carpio* mantidas em jejum desde o início da alimentação exógena até o final do experimento. Smit (2001) comenta que animais em condição de jejum prolongado podem ficar ligeiramente mais enriquecidos em ^{13}C e ^{15}N com o tempo devido as perdas dos isótopos mais leves (^{12}C e ^{14}N) pelos processos de catabolismo na forma de autólise das células dos próprios tecidos.

O comportamento isotópico das larvas alimentadas exclusivamente com a dieta seca (Larvas D) ficou mais claramente visualizado apenas para os isótopos estáveis de carbono (Figura 5A), que também revelou uma seqüência de valores em direção ao sinal do respectivo alimento, a dieta seca. Diferente das larvas que receberam náuplios (Larvas A), o comportamento das Larvas D começou a ser caracterizado somente aos seis dias de alimentação, que foi quando o valor isotópico dessas larvas diferenciou-se do perfil traçado pelas larvas mantidas em jejum (Larvas JJ). A semelhança entre as larvas D e Larvas JJ, aos três dias, pode estar relacionada com o fato de que, inicialmente, a quantidade de larvas necessária para formar o "pool" de amostras era muito alta, e na coleta realizada logo aos três dias, provavelmente, a maioria dos animais que formava o "pool" da amostra do tratamento D eram larvas que poderiam estar na mesma condição que as do jejum e que iriam morrer até o 11º dia, já que as taxas de sobrevivência no tratamento D foram baixas e variáveis (cerca de 5 a 20%).

Em relação aos valores do $\delta^{15}\text{N}$ das Larvas D, a interpretação dos dados deve ser mais cautelosa (Figura 5B). Os valores isotópicos observados praticamente traçaram uma tendência retilínea a partir do valor da larva inicial, que foi de $9,5\text{‰}$ para $9,6\text{‰}$, ao final de 42 dias. Em princípio, esses resultados nos fornecem uma "idéia" de que essas larvas D

mantiveram-se semelhantes às larvas do início do experimento. Mas, estes valores podem ter se igualados pelo fato da larva inicial ter apresentado um valor isotópico um pouco mais rico em ^{15}N que a dieta seca (Figura 5B) (graficamente, o valor numérico da larva inicial ficou pouco acima do valor da dieta seca, com uma diferença de apenas 2,1‰), diferentemente do ocorrido com o carbono (Figura 5A). Dessa maneira, o que pode ter acontecido é que o valor da concentração final das Larvas D, no patamar do equilíbrio isotópico, estaria se estabelecendo próximo ao valor das larvas iniciais, já que no patamar de equilíbrio, o valor do tecido, geralmente, também fica ligeiramente mais enriquecido que o alimento. De fato, se for verificado a média dos três últimos dados isotópicos das larvas A12D (Figura 7 C), animais que apresentaram crescimento com a dieta seca, esse valor foi de $9,4 \pm 0,1\text{‰}$.

A composição isotópica da larva inicial mais rica em ^{15}N que a dieta seca numa amplitude de apenas 2,1‰ não permitiu informações conclusivas, pelos isótopos estáveis de nitrogênio, quanto ao aproveitamento da dieta seca pelas larvas do tratamento D. Um dos fatores que têm dificultado a aplicação dos isótopos estáveis em estudos sobre assimilação dos nutrientes para larvas de peixes é justamente a similaridade do padrão isotópico das larvas no início da alimentação exógena com os possíveis alimentos aceitos pelas mesmas (SCHLECHTRIEM et al., 2004). Esses mesmos autores, para larvas carpa *Cyprinus carpio*, iniciando a alimentação exógena, testaram a alteração do valor isotópico do alimento vivo com sucesso, criando nematóides com duas fontes isotopicamente distintas (milho - C_4 e trigo - C_3), e conseguiram determinar o início da retenção dos nutrientes do alimento vivo no tecido larval, mas também alegaram que a precisão dos cálculos variou de acordo com amplitude isotópica existente entre os alimentos e a larva inicial. Lochmann e Phillips (1996), com juvenis de "golden shiners" *Notemigonus crysoleucas* criados em viveiros, também argumentaram que a contribuição relativa de cada tipo de alimento, vivo ou seco, no crescimento dos animais não foi clara em dois tratamentos, devido a similaridade isotópica dos alimentos e o fato do peixe inicial ter sido mais rico em ^{13}C que ambos os alimentos. Preston et al. (1996) sugeriram a manipulação do

valor isotópico das fontes alimentares, que no caso utilizaram náuplios de *Artemia* enriquecidos com ^{15}N para evitar a sobreposição de valores.

Analisando os resultados isotópicos das larvas que passaram pelo processo da substituição do alimento, mais precoce (A3D e A6D) ou tardiamente (A12D), e os resultados daquelas que receberam os dois alimentos por todo o período (A+D), claramente, puderam ser observados diferentes momentos em que as larvas começaram a apresentar sinais da dieta seca em seus tecidos, indicando diferenças no comportamento alimentar dessas larvas frente à disponibilidade do alimento seco (Figura 6 e 7).

Nas larvas A3D e A6D, enquanto o alimento eram os náuplios de *Artemia* (até três e seis dias, respectivamente), os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram semelhantes aos das larvas que receberam somente alimento vivo (Larvas A) (Figuras 6A e 6B e 7A e 7B). Após a supressão do alimento vivo, verificou-se que os sinais isotópicos desses animais começaram a apresentar uma ligeira mudança de direção, tendendo ao comportamento das larvas que haviam recebido apenas a dieta seca (Larvas D), tanto para carbono-13 como para nitrogênio-15. Os resultados de crescimento em comprimento e peso (Tabelas 2 e 3) dos animais desses tratamentos não demonstraram crescimento expressivo proporcionado pela dieta seca logo após a transição alimentar, não permitindo fazer nenhuma inferência sobre o aproveitamento da dieta seca nessa fase. Por outro lado, a sensibilidade da metodologia dos isótopos estáveis, permitiu a constatação que acréscimos mínimos de massa nos tecidos provocou alterações dos sinais isotópicos desses animais.

Larvas que receberam ambas as dietas desde o início do experimento (A12D e A+D), apresentaram, em geral, sinais isotópicos que acompanharam, até 12 dias, a tendência das Larvas A (Figuras 6C e 6D e 7D), denotando que nesses tratamentos os animais estavam ainda utilizando preferencialmente os nutrientes do alimento vivo para o crescimento. A partir de 12 dias, quando o alimento vivo foi totalmente suprimido no tratamento A12D, o valor do $\delta^{13}\text{C}$ dos animais que era de $-14,4\text{‰}$ aos nove dias e de $-13,9\text{‰}$ aos 12 dias (por causa dos náuplios) alterou para $-18,2\text{‰}$ após a supressão do alimento vivo, seguindo em direção ao sinal das larvas que receberam apenas dieta seca (Figura 6C). De fato, pelos resultados de

comprimento e peso (Tabelas 2 e 3), a substituição do alimento vivo nesse tratamento não prejudicou o crescimento dos animais e nem a sobrevivência como o verificado nas substituições mais precoces (A3D e A6D), ficando claramente evidenciado o potencial de aproveitamento da dieta seca pelas larvas nesse estágio do desenvolvimento, da ordem de 10mg de peso úmido. Com o $\delta^{15}\text{N}$, a inversão no sentido dos valores isotópicos em direção às Larvas D começou a ser verificada antes mesmo da substituição total do alimento vivo (Figura 7C), no período de seis a 12 dias, indicando o início do consumo e aproveitamento da dieta seca já na fase da alimentação mista quando os náuplios estavam sendo fornecidos em quantidades decrescentes. O mesmo não foi verificado entre as larvas A+D nesse período, que também tinham os dois alimentos disponíveis, mas sem a restrição quantitativa dos náuplios.

A busca natural da dieta seca pelas larvas A+D também foi constatada entre 12 e 18 dias (Figuras 6D e 7D); entretanto, larvas A12D, a partir de 12 dias, alteraram mais rapidamente sua composição isotópica, refletindo a incorporação dos átomos de carbono e nitrogênio da dieta seca (Figura 6C e 7C), e nas Larvas A+D, essa mudança ocorreu de forma progressivamente mais lenta (Figura 6D e 7D), denotando que os animais continuaram utilizando o alimento vivo que estava ainda sendo oferecido, mesmo sendo capazes de aproveitar eficientemente a dieta seca. Por outro lado, a busca voluntária da dieta seca ao longo do tempo na alimentação A+D tornou-se cada vez mais evidente, pois os animais abandonaram totalmente o comportamento dos que receberam apenas náuplios (Larvas A) e foram ao encontro daqueles alimentados exclusivamente com dieta seca (Larvas D).

Lochmann e Phillips (1996) determinaram pelos isótopos estáveis de carbono, a preferência alimentar de juvenis de "golden shiners" *Notemigonus crysoleucas* (peso médio de 1,4g) criados em viveiros e observaram uma contribuição do alimento natural em cerca de 40 a 83% de acordo com a qualidade das dietas fornecidas. Schoroeder (1983) trabalhando com animais maiores (juvenis de *Tilapia aurea* com 100 g) também identificou a

origem alimentar da principal fonte de carbono que foi incorporado no tecido animal, neste caso a dieta seca, mesmo os peixes tendo consumido uma grande quantidade de plâncton.

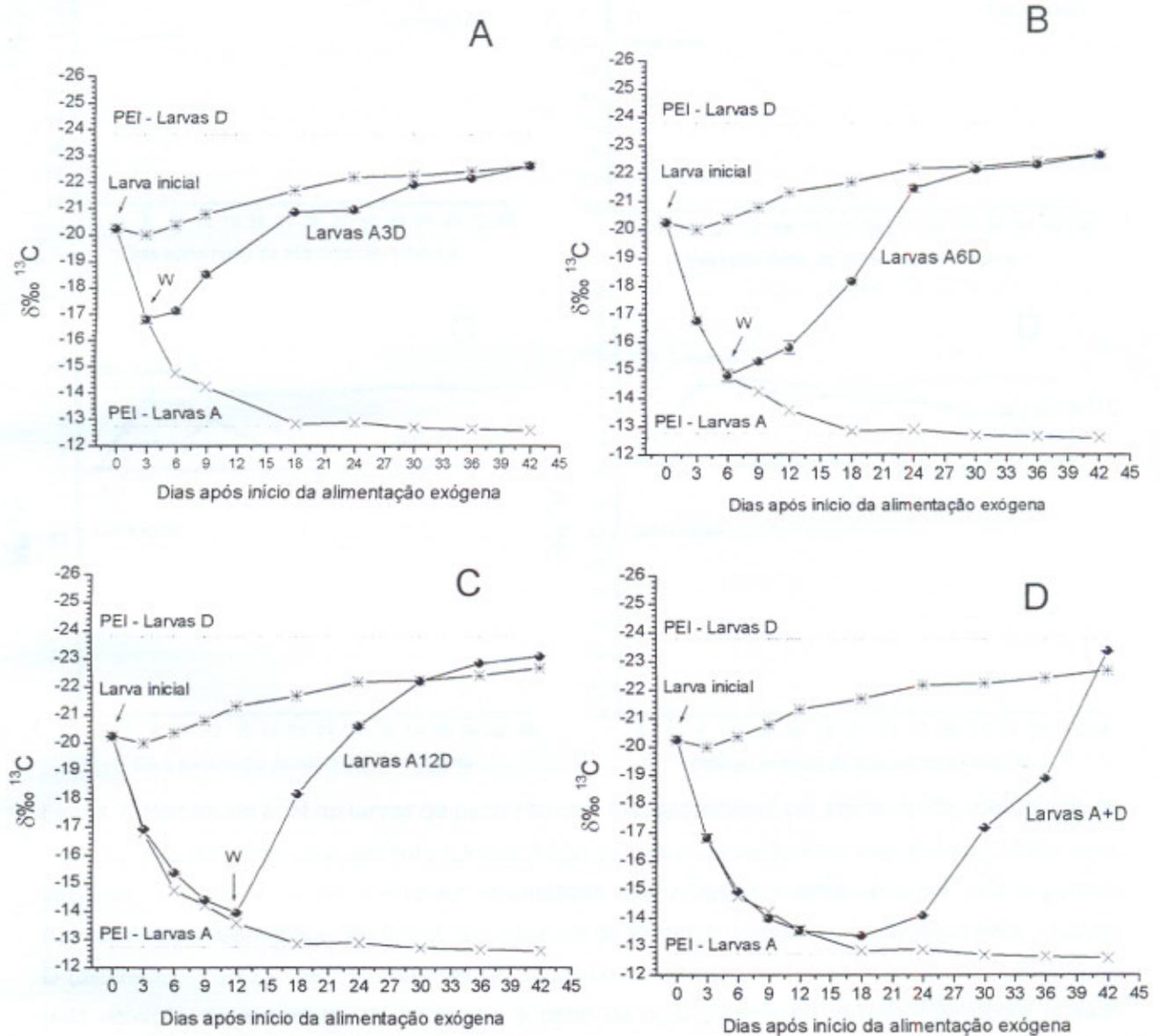


Figura 6. Valores do $\delta^{13}\text{C}$ de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três (Larvas A3D), seis (Larvas A6D) e 12 dias (Larvas A12D) após início da alimentação exógena e larvas alimentadas com náuplios + dieta seca por todo o período (Larvas A+D). Alimentação exclusiva com náuplios de *Artemia* - Larvas A (x) ou dieta seca - Larvas D (asterisco); PEI - valor no Patamar de Equilíbrio Isotópico das Larvas A e Larvas D (calculado pela equação exponencial). W: momento a partir do qual o alimento vivo foi totalmente retirado ("weaning").

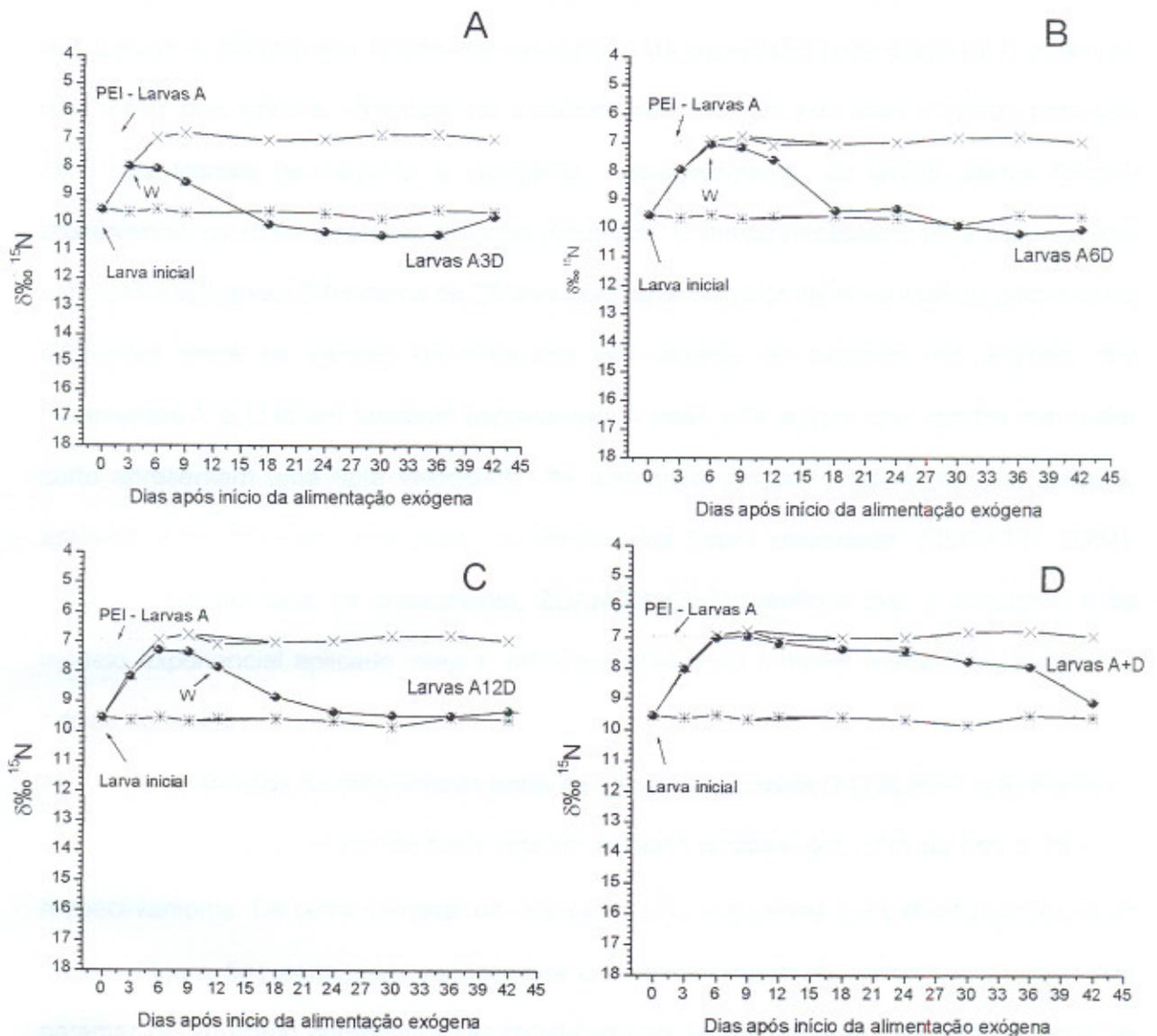


Figura 7. Valores do $\delta^{15}\text{N}$ de larvas de pacu *Piaratus mesopotamicus* em processo de substituição do alimento vivo por dieta seca aos três (Larvas A3D), seis (Larvas A6D) e 12 dias (Larvas A12D) após início da alimentação exógena e larvas alimentadas com náuplios + dieta seca por todo o período (Larvas A+D). Alimentação exclusiva com náuplios de *Artemia* - Larvas A (x) ou dieta seca - Larvas D (asterisco); PEI - valor no Patamar de Equilíbrio Isotópico das Larvas A e Larvas D (calculado pela equação exponencial). W: momento a partir do qual o alimento vivo foi totalmente retirado ("weaning").

A aplicação do modelo exponencial (DUCATTI et al., 2002) aos valores isotópicos das larvas que receberam apenas náuplios de *Artemia* (Larvas A) ou dieta seca (Larvas D) permitiram uma avaliação quantitativa, em unidades de tempo (meia-vida), da incorporação dos átomos de carbono e nitrogênio no tecido animal. O modelo proposto mostrou um bom ajuste aos dados observados (Figura 8).

Os valores da meia-vida (T) dos isótopos de carbono e nitrogênio no tecido larval das Larvas A, obtidos em função da constante k da expressão (vide página 87) foram de dois a três dias após a introdução do alimento, indicando ter sido esse o tempo para que 50% dos átomos de carbono e nitrogênio, respectivamente, do tecido animal fossem provenientes da fonte alimentar exógena (náuplios). O tempo necessário para essa mesma condição nas Larvas D foi cerca de 25 dias com base no valor da meia-vida do carbono. As diferenças entre os valores da meia-vida dos átomos de carbono nos animais dos tratamentos A e D foram bastante expressivas. A meia vida sugere que tecidos com valor curto apresentam uma "alta velocidade" de metabolização ou incorporação dos isótopos estáveis, e tecidos com uma meia vida longa, uma "baixa velocidade" (DUCATTI, 2004). Para animais em fase de crescimento, ZUANON (2003) verificou que a constante k do modelo exponencial aplicado integra, além dos efeitos do *turnover* metabólico, também a adição de tecido novo, pelo crescimento.

As diferenças de crescimento entre as Larvas A e Larvas D (Tabela 2 e 3) explicam a discrepâncias dos valores da meia-vida do carbono tecidual, por volta de três e 25 dias, respectivamente. De outra maneira, os valores do $\delta^{13}\text{C}$ das Larvas A e Larvas D ao longo do tempo (Figura 5A) permitiram verificar que o estabelecimento de valores isotópicos num patamar de equilíbrio começou a ser constatado no 24º dia para as Larvas A, quando os valores mantiveram-se praticamente constantes até o final ($-12,6\text{‰} \pm 0,07\text{‰}$), diferentemente do ocorrido com as Larvas D até o final do experimento. Essas diferenças no perfil isotópico das larvas em função do respectivo crescimento corroboram os achados por Smit (2001), que menciona que a taxa de crescimento determina o quão rapidamente ocorrerão às mudanças isotópicas no corpo dos animais.

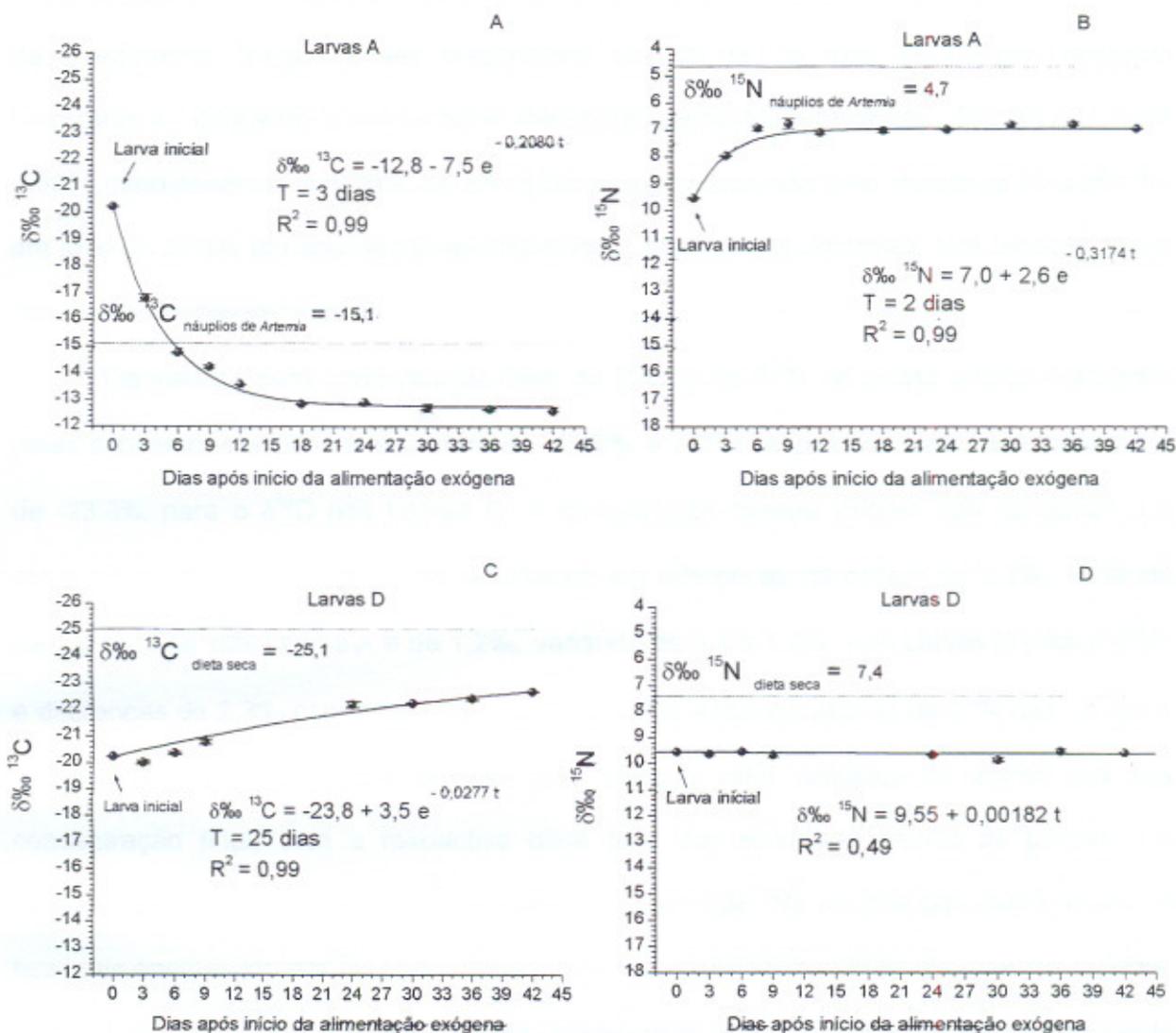


Figura 8. Valores do $\delta^{13}\text{C}$ (A e C) e $\delta^{15}\text{N}$ (B e D) de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia* (Larvas A) ou dieta seca (Larvas D). Em A, B e C a linha entre os valores isotópicos observados representa a curva exponencial ajustada para a aplicação do modelo descrito por Ducatti et al. (2002); T: valor da meia-vida do carbono e do nitrogênio no tecido larval.

A importância primária do acréscimo de massa corporal na alteração da composição isotópica do tecido animal tem sido bastante enfatizada em estudos com animais em fase de crescimento (HESSLEIN et al., 1993; ZANDEN e HULSHOF 1998; SMIT, 2001). Zuanon (2003) estudou o efeito da adição de tecido novo na velocidade de diluição isotópica do

carbono muscular em juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* e verificou que a taxa de crescimento chegou a ser responsável por 95,1% da taxa de diluição isotópica (constante k), enquanto que o *turnover* metabólico pelos 4,9% restantes. Zanden e Hulshof (1998), mencionaram que 86% da alteração isotópica ocorrida pela mudança do alimento, em juvenis de até um ano de "smallmouth bass" *Micropterus dolomieu*, fora explicada pelo acréscimo de massa tecidual.

Os valores para concentração final do $\delta^{13}\text{C}$ e do $\delta^{15}\text{N}$ no tecido animal estimados pelas expressões exponenciais foram de -12,8‰ e 7,0‰, respectivamente, nas Larvas A e de -23,8‰ para o $\delta^{13}\text{C}$ nas Larvas D. A comparação desses valores com os sinais dos respectivos alimentos consumidos resultaram em diferenças da ordem de 2,3‰, variando de 1,9 a 2,7‰, nas Larvas A e de 1,2‰, variando de 1,1 a 1,3‰, nas Larvas D para o $\delta^{13}\text{C}$, e diferenças de 2,3‰ com amplitudes de 2,0 a 2,6‰ entre os valores do $\delta^{15}\text{N}$ das Larvas A e do alimento. A ocorrência de variações entre o valor isotópico do animal (na sua concentração final) com a respectiva dieta tem sido reportada devido às perdas que ocorrem durante aos processos de respiração e excreção. Na maioria dos casos, o animal fica mais enriquecido em ^{13}C que a dieta (DE NIRO e EPSTEIN, 1978). Os mesmos autores, num estudo com várias espécies animais, observaram para o $\delta^{13}\text{C}$ valores de fracionamento entre o animal e a dieta em média de $0,8 \pm 1,1\%$, variando -0,6‰ a + 2,7‰. Peterson e Fry (1987), numa revisão dos isótopos estáveis em estudos sobre ecossistema, descreveram um enriquecimento da ordem de 0,0 a 1‰ e de 3 a 5‰ por nível trófico para o ^{13}C e ^{15}N , respectivamente.

Com juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, Zuanon (2003) verificou valores de fracionamento para os isótopos de carbono em 0,35 e 1,84‰ para os peixes que receberam dietas contendo fontes vegetais C_4 e C_3 , respectivamente. Furuya et al. (2002), alimentando juvenis de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (peso médio de 0,77g) com "peixe forrageiro" (lebiste *Poecilia reticulata*), observaram diferenças em 0,36‰. Usando os isótopos estáveis de enxofre, carbono e nitrogênio em juvenis de "broad whitefish"

Coregonus nasus, Hesslein et al. (1993) encontraram valores de fracionamento em 1,5, 2,0 e 3,8‰, respectivamente, mencionando que além do fracionamento metabólico dos isótopos, as diferenças entre tecido animal e dieta podem ter sido causadas também pela assimilação diferencial dos componentes da dieta.

Qualquer processo físico-químico pode criar um fracionamento isotópico mais ou menos acentuado (DUCATTI, 2004). Sotiropoulos e Wassenaar (2004) comentaram que vários fatores influenciam a variação dos resultados isotópicos além dos inerentes às amostras biológicas, como fatores externos (e.g. a técnica de processamento do material), de maneira que a eficácia e a comparabilidade das análises dos isótopos estáveis entre os estudos, dependem em parte da consistência das técnicas adequadamente empregadas pelos pesquisadores.

Grande parte das pesquisas que tem utilizado os isótopos estáveis como ferramenta metodológica em organismos aquáticos refere-se aos estudos da ecologia alimentar e da dinâmica e estrutura trófica no ecossistema. Para evitar interpretações equivocadas sobre a contribuição das possíveis fontes alimentares a partir da composição isotópica do animal, têm sido comentados nas pesquisas alguns procedimentos metodológicos para o preparo do material a ser analisado, desde a análise individual dos tecidos (DE NIRO e EPSTEIN, 1978; TIESZEN et al., 1983) ou do animal inteiro, quando de pequeno tamanho (DE NIRO e EPSTEIN, 1978); até a escolha do tecido apropriado (GANNES et al., 1998); a decaptação e evisceração do material biológico, a extração dos lipídeos das amostras e a preservação do material (SOTIROPOULOS e WASSENAAR, 2004).

Os isótopos estáveis constituem uma poderosa ferramenta para o rastreamento das fontes de carbono e nitrogênio na cadeia alimentar de um ecossistema, mas é uma técnica que também possui suas próprias restrições e limitações, devendo ser utilizada, quando possível, em conjunto com outras formas complementares de avaliações (GU et al., 1994; SMIT, 2001). É essencial considerar todas as possíveis fontes de variação no delineamento dos estudos, no planejamento das amostragens e subseqüentes análises e interpretações, para que o verdadeiro potencial da técnica dos isótopos estáveis na proporção da

abundância natural possa ser observado (Smit, 2001) Dessa forma, os procedimentos metodológicos devem estar claramente definidos e estreitamente ajustados ao objetivo do estudo para permitir um bom entendimento das informações.

Nas condições do presente trabalho, onde muitos fatores puderam ser efetivamente controlados (i.e. controle sobre as fontes alimentares, conhecimento da idade dos animais, acompanhamento periódico do crescimento das larvas ao longo do tempo etc.), pode-se dizer que a análise da composição isotópica das larvas separadas por categorias de tamanho, mesmo sendo animais de mesma idade, também foi um aspecto importante considerado na metodologia do estudo, principalmente com os animais numa fase mais adiantada do crescimento e naqueles tratamentos em que houve a mudança da fonte alimentar (Figura 4). Além desse procedimento, a garantia de um material biológico sem contaminantes (resíduos de alimento no tubo digestivo) permitiu a elucidação da incorporação dos nutrientes dos alimentos no tecido larval.

Em resumo, os resultados isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos tecidos larvais revelaram respostas consistentes, que puderam complementar e enriquecer as informações inicialmente geradas pelos resultados de desempenho de crescimento dos animais. A técnica dos isótopos estáveis permitiu verificar, com precisão, os diferentes momentos em que larvas começaram a utilizar os nutrientes da dieta seca através da retenção dos átomos de carbono e nitrogênio em seus tecidos, seja pela retirada total do alimento vivo, mais precoce ou tardiamente, ou pela escolha natural do alimento pelo peixe.

O comportamento isotópico larval mostrou-se intimamente relacionado com o respectivo tratamento alimentar aplicado e os resultados permitiram supor que, na primeira semana da alimentação exógena, as larvas de pacu se alimentaram preferencialmente de náuplios de *Artemia*, mesmo havendo disponibilidade de dieta seca; porém, na ausência ou restrição de alimento vivo, alguns animais ingeriram e assimilaram o alimento seco disponível, como verificado nas Larvas D, A3D e A6D. Por outro lado, esses animais tiveram o crescimento inicial e sobrevivência prejudicados em relação aos demais.

Larvas A12D com cerca de 10mg de peso úmido conseguiram aproveitar melhor e metabolizar eficientemente a dieta seca, indicando que, nessa fase, o alimento seco também foi aceitável e garantiu a continuidade do crescimento e a sobrevivência dos animais. Ressalta-se, porém, que o sucesso dessa prática para as larvas de pacu dependeu também da eficiência da dieta seca fornecida aos animais, pois conforme o verificado por Jomori et al. (2005 em preparação – capítulo 2 da presente Tese), as respostas de crescimento e sobrevivência com a substituição total do alimento vivo nesse mesmo período (12 dias e animais com cerca de 13mg de peso úmido) foram bastante variáveis em função das dietas secas utilizadas.

O início da escolha voluntária da dieta seca pelas Larvas A+D também foi demonstrado a partir de 12 dias; porém, mesmo sendo capazes de aproveitar eficientemente os nutrientes da dieta seca a partir desse período, os animais continuaram optando pelo alimento vivo por pelos menos mais 12 dias, quando então passaram a ingerir mais substancialmente a dieta seca, evidenciado por mudanças mais drásticas nos sinais isotópicos.

Sob o aspecto da produção comercial de juvenis, há que se ressaltar que a utilização exclusiva da dieta seca ou a sua introdução muito precoce em substituição do alimento vivo, não constituem, ainda, uma prática viável para as larvas de pacu, seja pela falta de dieta adequada que possam garantir crescimento e sobrevivência satisfatórios ou pela própria inabilidade fisiológica da larva. Protocolos de criação que utilizam organismos vivos por um período inicial maior, seja pela criação intensiva ou semi-intensiva, levam a resultados produtivos mais satisfatórios, permitindo a criação desses animais para a produção comercial de juvenis. A princípio, essas informações alertam a importância da disponibilidade do alimento vivo por um período inicial para garantir o sucesso da produção comercial de larvas de pacu, independente do sistema de criação. Por outro lado, abrem novas perspectivas em relação à elaboração de dietas secas com potencial de uso precoce na larvicultura dessa espécie.

Os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio foram eficientes como indicadores naturais dos alimentos aproveitados pelos animais na fase larval. Para as pesquisas que abordam aspectos sobre alimentação e nutrição de larvas de peixes, além das informações científicas sobre a assimilação dos nutrientes das dietas ao longo do desenvolvimento larval, uma grande contribuição do estudo foi mostrar que os isótopos estáveis, seguindo as premissas metodológicas necessárias, é uma ferramenta que pode ser utilizada nesse campo pela sensibilidade e precisão do método, através da retenção dos átomos de carbono e nitrogênio dos alimentos no tecido animal.

4. Agradecimentos

O autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão de Bolsa de Estudo e Reserva Técnica para a realização do presente trabalho.

5. Referências Bibliográficas

- BENDER, M. M. Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 10, p. 1239-1244, 1971.
- BENGTSON, D. A. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. In: Lavens P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. (Ed.). **FISH & CRUSTACEANS LARVICULTURE SYMPOSIUM**. Gent, Belgium: European Aquaculture Society, 1991. p. 142-143.
- CAHU, C.; ZAMBONINO, J. I. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v.200, p. 161-180, 2001.
- CRÉACH, V.; SCHRICKE, M. T.; BERTRU, G.; MARIOTTI, A. Stable Isotopes and Gut Analyses to Determine Feeding Relationships in Saltmarsh Macroconsumers. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Londres, v. 44, p. 599-611, 1997.
- DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present "state of art" and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 24, n. 6, p. 807-833, 1984.
- DEMPSON, J. B.; POWER, M. Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Ecology of Freshwater Fish**, Oxford, n. 13, p. 176-184, 2004.

- DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, New York, v. 42, p. 495-506, 1978.
- DITTEL, A. I.; EPIFANIO, C. E.; CIFUENTES, L. A.; KIRCHMAN, D. L. Carbon and Nitrogen Sources for Shrimp Postlarvae Fed Natural Diets from a Tropical Mangrove System. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Oxford, v. 45, p. 629-637, 1997.
- DUCATTI, C.; MATSUI, E.; SALATTI, E. Fundamentos teóricos dos fatores de correção para a análise das variações relativas das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por espectrometria de massa. **Energ. Nucl. Agric.** v.4, n.1, p.41-58, 1982.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, S. A.; PEZZATO, A.; MANCERA, P. F. A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.
- DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2004. 138p. Apostila.
- FENANDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. **Marine Biology**, Londres, v. 118, p. 323-328, 1994.
- FRY, B.; ARNOLD, C. Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Turnover During Growth of Brown Shrimp (*Penaeus aztecus*). **Oecologia**, Barcelona, v. 54, p. 200-204, 1982.
- FURUYA, V. R. B.; HAYASHI, C.; FURUYA, W. M.; SAKAGUTI, E. S. Replacement rates of carbon stable isotope (^{13}C) in muscle tissue of pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 20, n. 4, p. 461-472, 2002.
- GANNES, L. Z.; RIO, C. M.; KOCH, P. Natural Abundance Variations in Stable Isotopes and their Potential Uses in Animal Physiological Ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 119A, n. 3, p. 725-737, 1998.
- GERKING, S. D. Feeding ecology of fishes. San Diego: Academic Press, 1994. p.139-169.
- GU, B.; SCHELL, D. M.; ALEXANDER, V. Stable Carbon and nitrogen Isotopic Analysis of the Plankton Food Web in a Subarctic Lake. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v. 51, p. 1338-1344, 1994.
- HAMRE, K.; OPSTAD, I.; ESPE, M.; SOLBAKKEN, J.; HEMRE, G. I.; PITTMAN, K. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 139-148. 2002.

HESSLEIN, R. H.; HALLARD, K. A.; RAMLAL, P. Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v. 50, p. 2071-2076, 1993.

KENDALL, A. W.; AHESTROM, E.H.; MOSER, H. G. Early life history of fish and their characters In: Ontogeny and Systematics of Fish. In: H.G. Moser et al. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM DEDICATED TO THE MEMORY OF ELBERT HABOR AHESTROM, LaJolla, California: American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 1984. p.11-112. (Special Publications 1)

KLING, G. W.; FRY B. Stable isotopes and plankton trophic structure in Arctic Lakes. **Ecology**, Durham, v. 73, n. 2, p. 561-566, 1992.

JOMORI, R. K. **Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial.** Jaboticabal. 1999. 70 f. Trabalho de graduação em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

LOCHMANN, R.; PHILLIPS, H. Stable isotopic evaluation of natural and artificial foods by golden shiners *Notemigonus crysoleucas* in ponds. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 27, n. 2, p.168-177, 1996.

MACEDO-VIEGAS, E.M.; PORTELLA, M.C.; CARNEIRO, D.J. Utilization of fish protein hydrolysate in artificial diets for pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Journal of Applied Aquaculture**, Frankfurt, v.14, n.1/2., p.101-112, 2003.

MANETTA, G. I.; BENEDITO-CECILIO, E. Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de turnover em estudos ecológicos: uma síntese. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p.121-129, 2003

MICROCAL SOFTWAREORIGIN® 6.0 professional. Origin data analysis and technical graphics. USA, Microcal Software Inc., 1999.

MURCHIR, K. J.; POWER, M. Growth-and feeding-related isotopic dilution and enrichment patterns in young-of-the-year yellow perch (*Perca flavescens*). **Freshwater Biology**, Oxford, v. 49, p. 41-54, 2004.

O'LEARY, M. H. Carbon Isotopes in photosynthesis. **BioScience**, Washington, v. 38, n. 5, p.328-335, 1988.

- OWEN, S. F.; MCCARTHY, I. D.; WATT, P. W.; LADERO, V.; SANCHEZ, J. A.; HOULIHAN, D. F.; RENNIE, M. J. In vivo rates of protein synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts determined using a stable isotope flooding dose technique. **Fish Physiology and Biochemistry**, New York, v. 20, p. 87-94, 1999.
- PARKER, P. L.; ANDERSON, R. K.; LAWRENCE, A. A $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ tracer study of nutrition in Aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system. In: RUNDEL, P. W.; EHLERINGER, J. R.; NAGY, K. A. **Stable Isotopes in Ecological Research**, New York: Springer-Verlag, 1989. p. 288-3031.
- PLANAS, M., CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 171-190, 1999.
- PERSON LE RUYET, J. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. **Advance Tropical Aquaculture**, v. 9, p. 625-42, 1989.
- PETERSON, B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. In: **Annual Review Ecology Systematics**, Southampton, v. 18, p. 293-320, 1987
- PRESTON, N. P.; SMITH, D. M.; KELLAWAY, D. M.; BUNN, S. E. The use of enriched ^{15}N as an indicator of the assimilation of individual protein sources from compound diets for juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 147, p. 249-259, 1996.
- ROUNICK, J. S.; HICKS, J. The Stable carbon isotope ratios of fish and their invertebrate prey in four New Zealand rivers. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 15, p. 207-214, 1985.
- SEVILLA, A.; GÜNTHER, J. Growth and feeding level in pre-weaning tambaqui *Colossoma macropomum* larvae. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n.2, 218-224, 2000.
- SCHLECHTRIEM, C.; FOCKEN, U.; BECKER, K. Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. **Aquatic Ecology**, Heidelberg, v. 38, p. 93-100, 2004.
- SCHROEDER, G. L. Stable isotope ratios as naturally occurring tracers in the aquaculture food web. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 203-210, 1983.
- SCHMIDT, K.; McCLELLAND, J.W.; MENTE, E.; MONTOYA, J.P.; ATKINSON, A.; VOSS, M. Trophic-level interpretation based on $\delta^{15}\text{N}$ values: implications of tissue-specific fractionation and amino acid composition. **Marine Ecology Progress Series**, v. 266, p. 43-58. 2004.
- SMIT A. J. Source identification in marine ecosystems: Food web studies using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. In: UNKOVICH, M.; PATE, J.; MCNEILL, A.; GIBBS, D.J. (Ed.) **Stable Isotope Techniques in the**

Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. p. 219-245.

SOTIROPOULOS, M. A.; TOM, W. M.; WASSENAAR, L. I. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. **Ecology of Freshwater Fish**, Oxford, v. 13, p. 155-160, 2004.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated. **Journal of Applied Aquaculture**, v. Frankfort, v.17, n. 2, p. 47-59, 2005.

TIESZEN, L. L.; BOUTTON, T. W.; TESDAHL, K. G.; SLADE, N. A. Fractionations and turnover of stable isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, Heidelberg, v. 57, p. 32-37, 1993.

TYRREL, H. F.; PELLETIER, G.; CHEVALIER, R.; HILLAIRE-MARCEL, C.; GAGNON, M. Use of Carbon 13 as Tracer in Metabolism Studies. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 64, n.127-129, 1984.

WATANABE T.; KIRON, V. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124, p. 223-251, 1994.

ZANDEN, M. J. V.; HULSHOF, M. Application of stable isotope techniques to trophic studies of age-0 smallmouth bass. **Transactions of the American Society**, Bethesda, v. 127, p. 729-739, 1998.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Editora Prentice – Hall. 1998. 930 p.

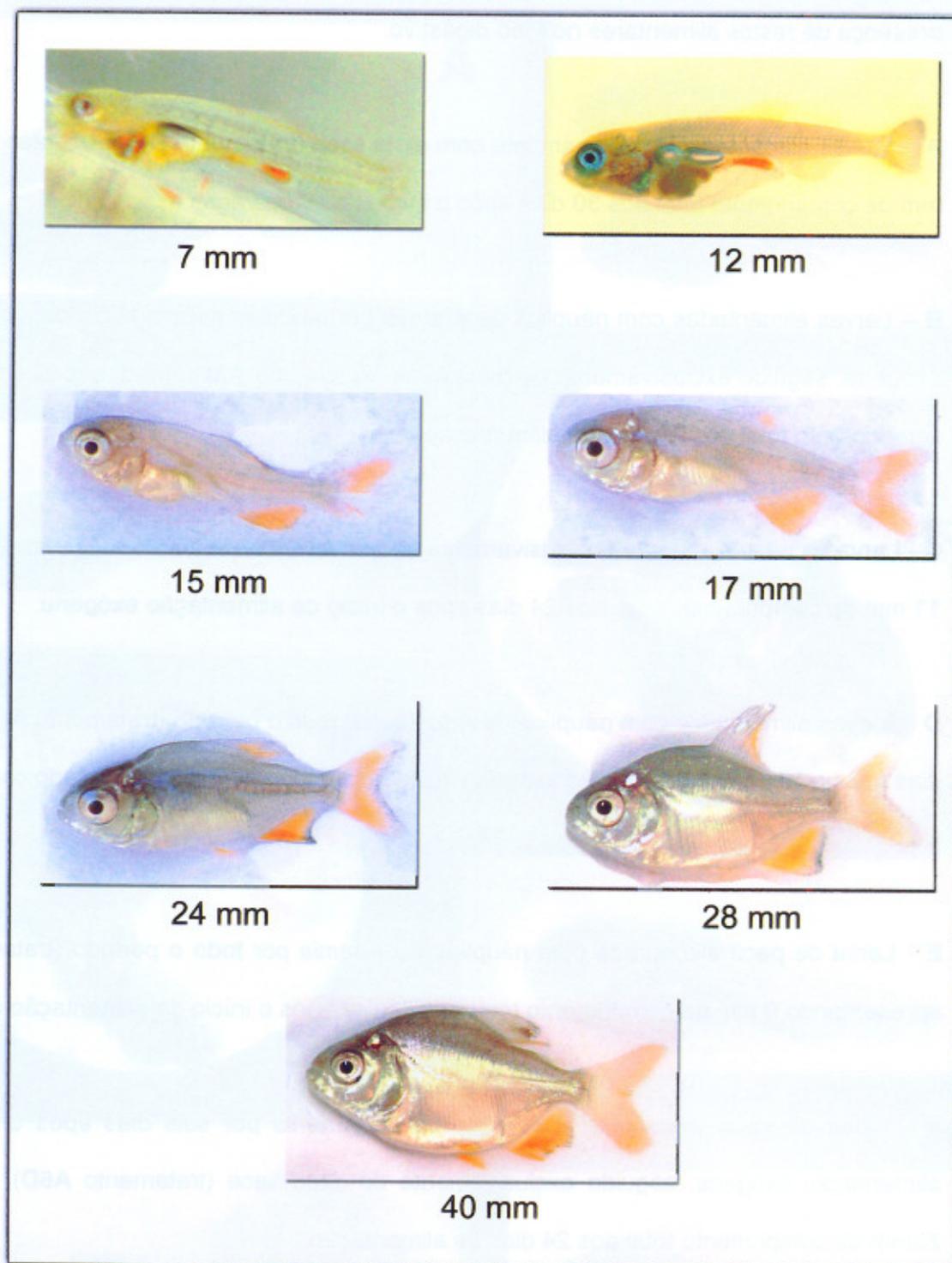
ZUANON, J A. S. **Turnover de carbono em tecido muscular de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio dos isótopos estáveis de carbono (^{13}C / ^{12}C)**. 2003. 96 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.



Figura 1. Exemplares do protozoário *Paracitrus microcisticus* de diferentes tamanhos, em crescimento total (mm), evidenciando as mudanças morfológicas entre os animais ao longo do desenvolvimento.

ANEXOS





Anexo 1. Exemplos de pacu *Piaractus mesopotamicus* de diferentes tamanhos, em comprimento total (mm), evidenciando as diferenças morfológicas entre os animais ao longo do desenvolvimento larval.

Anexo 2. Larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* de diferentes tamanhos evidenciando a presença de restos alimentares no tubo digestivo.

A – Larvas alimentadas exclusivamente com dieta seca (tratamento **D**) apresentando 8 e 13 mm de comprimento total aos 30 dias após o início da alimentação exógena.

B – Larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* por três dias após o início da alimentação exógena, seguido exclusivamente de dieta seca (tratamento **A3D**), medindo 10 e 12mm de comprimento total aos 24 dias de alimentação.

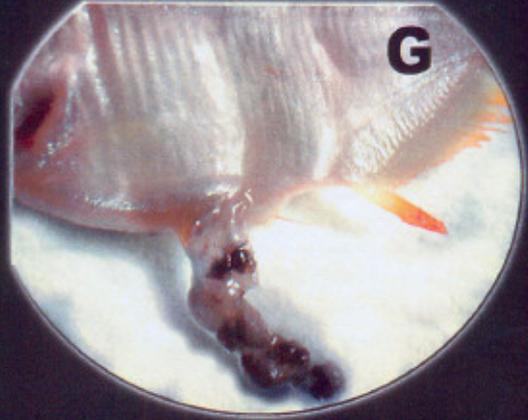
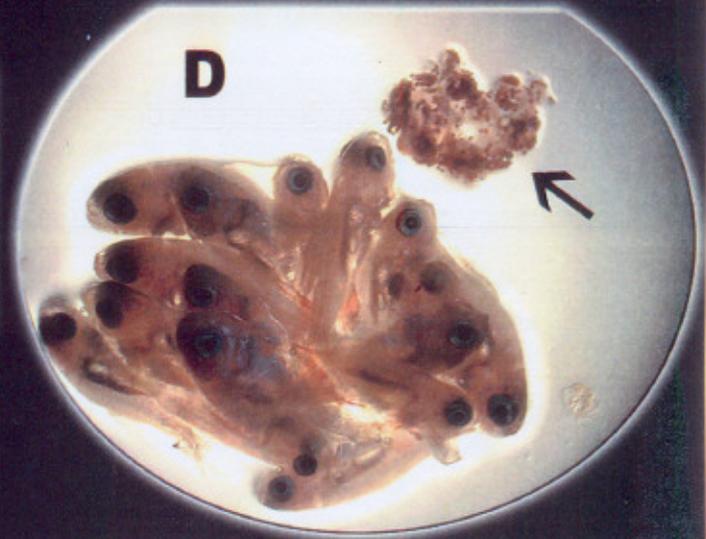
C - Larva de pacu alimentada exclusivamente com dieta seca (tratamento **D**) apresentando 11 mm de comprimento total, aos 24 dias após o início da alimentação exógena.

D – Larvas alimentadas com náuplios de *Artemia* por todo o período (tratamento **A**) aos 18 dias após o início da alimentação exógena. Seta indica tubo digestivo dissecado contendo cistos.

E - Larva de pacu alimentada com náuplios de *Artemia* por todo o período (tratamento **A**) apresentando 9 mm de comprimento total, aos 9 dias após o início da alimentação exógena.

F - Larva de pacu alimentada com náuplios de *Artemia* por seis dias após o início da alimentação exógena, seguido exclusivamente de dieta seca (tratamento **A6D**), medindo 23mm de comprimento total aos 24 dias de alimentação.

G e H – Tubo digestivo de exemplar de pacu com 42 dias após o início da alimentação exógena evidenciando a presença de restos alimentares (tratamento **A12D**).



Conclusões gerais e considerações

- Os náuplios de *Artemia* foram mais efetivos que o plâncton natural para a alimentação de larvas de pequi criadas em laboratório, pois favoreceram o crescimento e o desenvolvimento ontogenético do trato digestório.
- A composição do plâncton interfere nos resultados de crescimento e sobrevivência de larvas de pequi. As taxas de crescimento específica proporcionada pela alimentação à base de plâncton natural foram bastante variáveis (3 a 45%) em função dos organismos predominantes na composição desse alimento, que, na maior parte do tempo, foram esrotíferos e náuplios de copépodos. No período em que a presença de cladoceros foi mais significativa, a taxa de crescimento específico com o plâncton natural chegou a ser o dobro da obtida com os náuplios de *Artemia*.
- As taxas de sobrevivência das larvas ao final de 15 dias não foram influenciadas pelo tipo de alimento vivo fornecido, podendo ser consideradas satisfatórias (~70 a 80%). Por outro lado, quando houve a predominância de fêmeas adultas do copépodo ciclovida *Thermocyclops decipiens* a taxa de sobrevivência foi reduzida em 37%.
- Pela primeira vez foi demonstrado que larvas de pequi podem ser alimentadas com dieta seca desde a primeira alimentação. Entre 3 a 20% das larvas sobreviveram com essa fonte de alimento exógena. Por outro lado a taxa de crescimento foi bastante reduzida em comparação com a alimentação à base de náuplio, por toda o período de com o fornecimento dos náuplios até as 15 dias.

Conclusões Gerais e Considerações

Conclusões gerais e considerações

- Os náuplios de *Artemia* foram mais efetivos que o plâncton natural para a alimentação de larvas de pacu criadas em laboratório, pois favoreceram o crescimento e o desenvolvimento ontogenético do trato digestório.
- A composição do plâncton interfere nos resultados de crescimento e sobrevivência de larvas de pacu. As taxas de crescimento específico proporcionada pela alimentação à base de plâncton natural foram bastante variáveis (3 a 45%) em função dos organismos predominantes na composição desse alimento, que, na maior parte do tempo, foram os rotíferos e náuplios de copépodos. No período em que a presença de cladóceros foi mais significativa, a taxa de crescimento específico com o plâncton natural chegou a ser o dobro da obtida com os náuplios de *Artemia*.
- As taxas de sobrevivência das larvas ao final de 15 dias não foram influenciadas pelo tipo de alimento vivo fornecido, podendo ser consideradas satisfatórias (~79 a 88%). Por outro lado, quando houve a predominância de fêmeas adultas do copépodo ciclopóida *Thermocyclops decipiens* a taxa de sobrevivência foi reduzida em 37%.
- Pela primeira vez foi demonstrado que larvas de pacu podem ser alimentadas com dieta seca desde a primeira alimentação. Entre 3 a 20% das larvas sobreviveram com essa fonte de alimento exógena. Por outro lado a taxa de crescimento foi bastante reduzida em comparação com a alimentação à base de náuplios por todo o período ou com o fornecimento dos náuplios até as larvas atingirem pelo menos 10mg.

- O tamanho da larva é um aspecto importante a ser considerado para a substituição do alimento vivo por dieta seca. Mas, sobretudo, a qualidade da dieta seca é decisiva para garantir o sucesso desse procedimento, principalmente na fase mais precoce (larvas com 13mg de peso).
- Larvas de pacu, até 12 dias após o início da alimentação exógena (10mg), consumiram preferencialmente náuplios de *Artemia*. Entretanto, quando forçadas à ingestão de dieta seca, as larvas (com 1 e 2mg) mostraram sinais de aproveitamento desse alimento, através da incorporação do carbono e nitrogênio da dieta em seus tecidos. Porém, a taxa de sobrevivência foi reduzida;
- Larvas acima de 10mg mostraram-se mais preparadas para metabolizar eficientemente a dieta seca, bem como para o início da escolha voluntária desse alimento. Por outro lado, os animais que tiveram a livre escolha dos alimentos continuaram utilizando preferencialmente o alimento vivo por pelo menos mais 12 dias.
- A substituição do alimento vivo logo na primeira semana da alimentação exógena não é um procedimento ainda tecnicamente aplicável e viável, seja pela falta de dietas secas de qualidade adequada para isso ou pela própria inabilidade da larva. O sucesso para a substituição precoce do alimento vivo obtido no presente estudo foi determinado principalmente pela qualidade da dieta utilizada. Tendo em vista que a principal técnica para a criação das larvas de pacu no Brasil consiste na utilização de viveiros fertilizados, estudos com as dietas secas para larvas disponíveis no mercado nacional devem ser realizados, no

sentido de avaliar a qualidade das mesmas e, conseqüentemente, definir os momentos mais adequados para a sua utilização como alimento substituto, e assim nortear o uso econômico desse alimento no viveiro.

- A possibilidade de substituir o alimento vivo precocemente na larvicultura do pacu sem prejuízos ao desempenho dos animais e o uso exclusivo da dieta seca como primeiro alimento abrem novas perspectivas para dar continuidade às pesquisas que visam a elaboração de dietas secas adequadas para as larvas;
- A técnica dos isótopos estáveis foi bastante eficaz na indicação das fontes energéticas aproveitadas e metabolizadas pelas larvas e pode contribuir para o aprimoramento de muitas pesquisas nesse campo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)